

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Susceptibilidad al virus herpes simple tipo 1: contribución de
complejos genéticos polimórficos relacionados con la citotoxicidad
celular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Manuela Moraru

Director

Blas Carlos Vilches Ruiz

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. MICROBIOLOGÍA I



**SUSCEPTIBILIDAD AL VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1:
CONTRIBUCIÓN DE COMPLEJOS GENÉTICOS
POLIMÓRFICOS RELACIONADOS CON LA
CITOTOXICIDAD CELULAR**

MANUELA MORARU

DIRECTOR: BLAS CARLOS VILCHES RUIZ

MADRID, 2015

ADCC, Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
ADN, Ácido Desoxirribonucleico
APC, Célula presentadora de antígenos
ApoE, Apolipoproteína E
ARN, Ácido Ribonucleico
hCMV, Citomegalovirus humano
CBP, *CREB binding protein*
CTL, Linfocito T Citotóxico
CSSG-1, *Cold Sore Susceptibility Gene 1*
DC, Célula Dendrítica
EBV, Virus de Epstein-Barr
FcγR, Receptor para el Fragmento cristalizable de la IgG
FcγRv, FcγR viral
FcεRIγ, Cadena γ del Receptor para el Fragmento cristalizable de la IgE, FcεRI
HCF, *Host Cell Factor*
HLA, Antígeno Leucocitario Humano
HIV, Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HSE, Encefalitis Herpética
HSV, Virus Herpes Simple
Hve, Receptor para la Entrada de Herpesvirus
ICP, *Infected Cell Protein*
IE, *Immediate Early*
IFN, Interferón
Ig, Inmunoglobulina
IRF, *Interferon Regulatory Factor*
ITIM, Secuencia Inhibidora de Inmunorreceptores que contienen Tirosinas, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*
ITAM, Secuencia Activadora de Inmunorreceptores que contienen Tirosinas, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*
Jak, Quinasa de Jano
KIR, *Killer-cell Ig-like Receptor*
LAT, Transcrito Asociados a la Latencia, *Latency Associated Transcript*
LILR, *Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor family*
LRC, Complejo de Receptores Leucocitarios, *Leukocyte Receptor Complex*
MDA-5, *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*
MHC, Complejo Principal de Histocompatibilidad
MLPA, amplificación múltiple de sondas dependiente de la ligación, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
NCR, Receptor de la Citotoxicidad Natural
NEMO, *NF-κB Essential Modulator*
NF-κB, Factor Nuclear-κB
NK, Célula Citotóxica Natural
NKC, Complejo NK, *NK Complex*
PAMPs, Patrones Moleculares derivados de Patógenos

PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-SSP, PCR con cebadores específicos de secuencia
PRR, Receptor de Reconocimiento de Patrones
RIG-1, *Retinoic acid-Inducible Gene 1*
SNP, Polimorfismo de un Solo Nucleótido
Stat, *Signal Transducer and Activator of Transcription*
TAP, Transportador de Péptidos Antigénicos
TBK1, *TANK-Binding Kinase 1*
TCR, Receptor de Células T
TLR, *Toll-like Receptor*
TNF, Factor de Necrosis Tumoral
TRAF, *TNF Receptor Associated Factor*
TRIF, *TIR-domain-containing adapter-Inducing Interferon- β*

A Carlos, por confiar en mí, por su paciencia (que no es poco tratándose de mí), por descubrirme un mundo que ignoraba, y sobre todo por iniciarme en el camino de la ciencia.

A los que me apoyaron y confiaron en mí durante mis primeros pasos de esta larga carrera, y que, desgraciadamente ya no están para los nuevos alumnos, Verónica Dinu y Florin Draghia. Y al Dr. Bâra, por descubrirme ese maravilloso mundo de la inmunología.

A Aresio, a Arantxa, a Luís, a María y especialmente a Charo de Pablo y a Fernando, por su cariño, su sabiduría y por compartir con todos nosotros tantos misterios de la inmunología y... mucho más. A Esperanza y a Charo Solís, a Mariví y a Palmira, a Helena y a Charo Martín, a María José y a Matilde, a Isabel y especialmente a Marisa, por esa acogida tan cálida y por vuestro apego.

A Elisa, por todo lo que hemos compartido durante estos años y por ser “mis oídos” en innumerables ocasiones. A David, por enseñarme que uno se puede ilusionar con algo tan abstracto como una mutación y por ayudarme a saber que sí, en Rumanía realmente hay un trocito de la antigua Galicia ☺. A Elvira, por apoyarme cuando más lo necesitaba.

A Marta y a Nata, por vuestro cariño y por ser... como sois; a Marlene, por el equilibrio que siempre ha aportado al entorno; a Kelly, por su alegría y a Karina, por su franqueza. A Ana, a Rocío, a Ángel, a Ana A.C.S.I. :P, a Vanesa, a David, a “las Irenes”, a Rodri, a Laura y también a María Cañizares, por los buenos ratos durante los periodos de descanso diario. A Natalia por esos respiros tan bienvenidos y... enriquecedores☺.

A mis compañeras y amigas que siempre han creído en mí Cristina, Alexa, Suza, y especialmente a Ana, siempre tendrás un lugar en mi corazón. También a Ale, sin tu ayuda no habría sido posible seguir este camino.

A mis padres, a mi hermana y a mis abuelos, por su apoyo incondicional; he llegado hasta aquí gracias a vosotros. A Margarita y Ramón, “mi nueva familia” con la que nunca habría siquiera osado soñar, sois mucho más de lo que cualquiera pueda desear.

... y a Alberto, por contribuir a cada uno de los detalles de esta tesis pero sobre todo por estar siempre a mi lado y... por todo lo demás ☺.

Resumen	1
Introducción	7
1. El virus Herpes simple tipo 1	7
1.1. El curso clínico de la infección por HSV-1	7
1.2. Estructura del HSV-1	8
1.3. Estadios de la infección productiva	8
1.4. La infección latente	10
2. La Respuesta inmunitaria frente a HSV-1	11
2.1. Producción de citoquinas en respuesta a patrones moleculares virales	11
2.2. Moléculas polimórficas en la interfaz entre la respuesta inmunitaria innata e adaptativa	13
2.2.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad	13
2.2.2. Receptores de células NK para HLA de clase I	18
2.2.2.1. Los KIR (<i>Killer-cell Ig-like Receptors</i>)	19
2.2.2.2. Los heterodímeros CD94/NKG2	24
2.2.3. Los receptores para el fragmento cristalizable de la IgG	27
2.2.4. Alotipos de las inmunoglobulinas	32
2.3. La respuesta inmunitaria celular y humoral	34
2.3.1. Las células NK	34
2.3.2. Los linfocitos T	36
2.3.3. La inmunidad humoral	38
3. Mecanismos de inmunoevasión del HSV-1	38
Objetivos	41
Publicaciones	45
1. Host genetic factors in susceptibility to Herpes simplex type 1 virus infection: Contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity	48
2. Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction	78
3. NK cells and immunoglobulins interplay in defense against Herpes simplex virus type 1: epistatic interaction of CD16A and IgG1 allotypes of variable affinity modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity and susceptibility to clinical reactivation	88
Discusión	116
1. La influencia del polimorfismo genético del sistema HLA	119
2. Las implicaciones de la variabilidad de los KIR y sus ligandos	122
3. El receptor NKG2C	126
4. El polimorfismo genético de los complejos FCGR e IGH	128
4.1. Los alotipos CD16A-158V y G1m3	128
4.2. El dimorfismo funcional CD32A-131H/R	130
4.3. Los polimorfismos genéticos que condicionan la expresión de CD32B y CD32C en las células NK	130
5. Otros polimorfismos genéticos del hospedador que modifican el curso clínico de la infección	133
Conclusiones	136
Bibliografía	140
Anexo	160

Susceptibility to Herpes simplex virus type 1 – Contribution of polymorphic host genetic complexes involved in cellular cytotoxicity

Background

Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) is a wide-spread human pathogen that infects most adults in early life and establishes life-long latent infection in sensitive ganglia. Quiescent HSV-1 can reactivate periodically in response to certain signals (UV-light exposure, fever, stress) and produce recurrent disease, most often at the site of primary infection. The clinical course of HSV-1 infection varies remarkably, from asymptomatic virion excretion to patients with more than one clinically relevant episode monthly. While the most common clinical picture of HSV-1 reactivation is herpes labialis, a minority of the infected individuals can develop life-threatening episodes of herpetic encephalitis, sepsis-like syndrome, eczema herpeticum, herpetic keratitis or congenital disease. Immunosuppressed individuals are prone to these exacerbated or frequent HSV-1 manifestations, but symptomatic reactivations also occur in many otherwise healthy individuals. Susceptibility to clinically relevant HSV-1 reactivation is thought to depend on the virus itself, environmental factors and host genetics.

HSV-1 (*Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily) is a large (150-200 nm), spherical, DNA enveloped virus, whose genome includes more than eighty genes. HSV-1 gene transcription follows a stepwise sequence, where three major gene groups are distinguished: immediate early (IE), early and late genes. IE genes are transcribed without prior HSV-1 protein synthesis, as their promoters exploit the host cell transcriptional machinery. IE-gene encoded proteins promote the transcription of early genes and a subset of late genes, which conduct virus DNA and structural proteins synthesis in the productive stage of the infection. Though the classical definition of HSV-1 latency implies viral genome retention in neurons without virion production, there is increasing evidence of limited viral transcription and protein synthesis during this quiescent stage.

Interferons, cytotoxic lymphocytes (mainly T lymphocytes and NK cells), dendritic cells (DCs) and antibodies have all been involved in host immune response to HSV-1. Like other *Herpesvirus*, HSV-1, in turn, developed a large array of immunoevasion mechanisms, further confirming the importance of host immune control of the infection. Examples include ICP47 binding to the transporter for antigenic peptides (TAP), thus blocking HLA class I-mediated Ag presentation; and viral glycoproteins gE and gI generation of a receptor for the Fc of IgG, which could protect the infected cells from both complement- and cell-mediated lysis.

Goals and objectives

The goal of the present work was to assess host immunogenetic factors contribution to the variable susceptibility to clinical HSV-1 infection.

1. To evaluate HLA polymorphism role in the outcome of HSV-1 infection.
2. To assess the impact of KIR and their ligand genetic diversity on the clinical expression of HSV-1 infection.
3. To design an efficient method for the assessment of *KLRC2 (NKG2C)* copy-number variation and to evaluate its contribution to the susceptibility to HSV-1 recurrent infection.
4. To explore whether *FCGR* and *IGH* genetic variation modifies the clinical course of HSV-1 infection and the intensity of NK-cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against opsonised, HSV-1 infected targets.

Methodology and results

We performed genetic and functional studies on samples (DNA, sera and peripheral blood mononuclear cells, PBMC) derived from 302 healthy individuals, of whom 164 had symptomatic HSV-1 infection and 138 were asymptomatic.

1. HLA polymorphism contribution to the clinical course of HSV-1 infection

Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTL) recognize viral peptides presented by infected cells and DCs on HLA class I molecules. Differentiation of antigen-specific CTLs and generation of memory CD8⁺ T lymphocytes require functional CD4⁺ T helper cells, which, in turn, depend on antigen presentation on HLA class II molecules and co-stimulation by DCs. The extreme polymorphism of the HLA system conditions the peptide repertoire of each individual and, eventually, the antigen presentation efficacy. To assess whether this genetic diversity modifies the clinical course of HSV-1 infection, we used PCR-based methods to analyse the HLA allele distribution in the different subgroups of individuals included in this study.

Class II HLA-DRB1 allele frequencies had overall similar distributions among the symptomatic and asymptomatic subgroups. In contrast, differences between the two clinical subgroups were observed when HLA class I genes (HLA-A, B and C) were compared. In particular, we found two significant associations, not previously described; the presence of HLA-B*18 allele was increased in asymptomatics, whereas HLA-C*15 allele was more frequently found in symptomatic individuals. Furthermore,

we found a trend similar to that previously described in an Italian population, where a negative association with HLA-B*35 was detected; and logistic regression analysis identified the A19 group of HLA-A alleles as a risk factor for recurrent, herpetic infection.

One patent reason for an HLA allele to be protective would be its capacity to bind immunodominant virus peptides with high affinity. We thus assessed whether the previously identified protection and susceptibility HLA molecules can present peptides derived from viral proteins encoded by IE genes. To that end, we used a peptide prediction tool that takes into account MHC binding, proteasomal cleavage and TAP transport efficacy and found that these HLA alleles encode molecules that differ in their capacity to present peptides derived from viral protein ICP0, a key viral component for the maintenance of the balance between latency and reactivation encoded by a IE gene. Polymorphism also determines additional functional variability that influences the capacity of an HLA molecule to efficaciously present virus antigens, such as the degree of dependency on a fully functional peptide-loading complex (targeted by HSV-1). Indeed, both HLA-B*18 and HLA-B*35, apparently conferring protection from HSV-1, have been recently confirmed to function independently of tapasin.

2. KIR and their ligand genetic diversity impact on the outcome of HSV-1 infection

Human NK cells survey abnormal expression of HLA class I molecules through several families of surface receptors, including Killer-cell Ig-like Receptors (KIR) and CD94/NKG2 heterodimers. The KIR family is highly diverse, owing to remarkable copy-number variation, allelic polymorphism, expression frequency and levels, and capacity to bind distinct sets of HLA ligands with variable avidity. This functional and genetic diversity brought about a study of our group which found that the presence in the genome of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* associated with recurrent, symptomatic HSV-1 reactivations. We used a PCR with sequence specific primers (PCR-SSP) designed in our laboratory to study the KIR genotype in the current cohort and confirmed this association. Furthermore, we found that the presence of both *KIR2DL2* and its HLA-C1 ligand in the genome was more common in symptomatic individuals, its highest frequency being observed in patients with many clinically relevant reactivations (more than two flares yearly in the maximum activity period). Of note, a high proportion of symptomatic individuals encoding both high-affinity receptor/ligand pairs 2DL2/HLA-C1 and 2DL1/HLA-C2 was also observed. This observation suggests that an excessive inhibition of KIR⁺ NK cells in the presence of their corresponding ligands could explain the association with symptomatic herpes. Yet, functional studies are required to formally confirm that the genetic association with herpetic disease is due to *KIR2DL2*

and not *KIR2DS2*, which encodes an activating homolog receptor and is in nearly complete linkage disequilibrium with *KIR2DL2*; these studies are, though, hampered by lack of specific antibodies for these receptors.

3. KLRC2 (NKG2C) copy-number in susceptibility to HSV-1 recurrent infection.

In contrast with KIR, the CD94/NKG2 family of C-type lectin-like receptors encoded in the NK complex (NKC) on chromosome 12 is largely conserved. However, a deletion in the NKC determines copy-number variation (CNV) of the gene coding for the activating receptor NKG2C (*KLRC2*). This deletion is found in about 30% of the population, and ~4% of healthy individuals completely lack the gene. NKG2C is expressed at high levels on subsets of NK cells and CTL from a subgroup of individuals infected by cytomegalovirus, these NKG2C^{bright} cells being involved in the control of the infection.

We thus designed a PCR-SSP method for the assessment of *KLRC2* CNV and its putative implications in the clinical course of HSV-1 infection. This technique combines the simplicity and robustness of a standard PCR with the capacity to detect, in a unique reaction, *KLRC2* presence or absence in the genome in homo- or heterozygosis. The method has already been used in other studies, one particular result derived if its use being the demonstration that NKG2C expression levels and functionality are modified by *KLRC2* CNV. Our results show no relation between NKG2C deletion and susceptibility to HSV-1.

4. FCGR and IGH polymorphism modulates overall risk to suffer recurrent HSV-1 infection and NK cell-mediated ADCC against infected targets

Antibody response, a mainstay of adaptive immunity, encompasses complex effector mechanisms, including antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). ADCC is one pathogen clearance mechanism which depends on simultaneous binding of IgG molecules to infected cells and to FcγR expressed on a variety of effector leukocytes. Genetic polymorphism in both *FCGR* and *IGH* loci, coding for FcγR and the constant regions of IgG heavy chain, respectively, potentially modulates ADCC intensity and the outcome of HSV-1 infection.

We used a polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) method to screen for *FCGR3A* (CD16A) and *FCGR2A* (CD32A) functional polymorphism, a TaqMan genotyping assay for IgG1 allotype detection (a collaboration with Dr. J. Pandey, University of South Carolina), and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) to assess genetic variation in *FCGR* locus conditioning CD32B and CD32C expression on NK cells. Furthermore, we assessed these

polymorphisms contribution to NK cell-mediated ADCC against HSV-1 infected cells *in vitro*. To that end, we used as targets human HSV-1-infected fibroblasts opsonised with HSV-1-immune sera from donors with different IgG1 allotypes, and PBMCs from donors with different CD16A, CD32B and CD32C genotypes as a source of NK effector cells.

A valine for phenylalanine change at position 158 of CD16A increases the receptor affinity for IgG1 and IgG3. Equally relevant for HSV-1 infection could be IgG1 allotypes because they influence IgG binding affinity to both host and viral FcγR decoy. Our results showed that the higher affinity CD16A-158V allotype in homozygosis is underrepresented among individuals susceptible to develop HSV-1 disease, and this negative association was restricted to those donors with a G1m3/3 IgG1 genotype. Likewise, we observed increased percentages of degranulating NK cells derived from CD16A-158V/V individuals, when exposed to HSV-1⁺ fibroblasts opsonized with sera from G1m3/3 donors, compared to any other CD16A-158/IgG1 genotype combination.

Conversely, arginine for histidine change at 131 residue of CD32A, which increases receptor affinity for IgG2, had no significant influence on the clinical course of HSV-1 infection. And neither did Ig light chain Km allotypes (Km1 and Km3), or the combined presence of CD32A-131/G1m, CD32A-131/Km, CD16A-158/Km or G1m/Km allotypes.

Genetic polymorphisms determining in a minority of individuals the expression of activating CD32C (a non-functioning gene in most humans) or inhibitory CD32B on NK cells (normally restricted to B lymphocytes and myeloid cells), could also modify cellular response against IgG-coated infected cells. However, we found no significant influence of these genetic variations on either the NK cell-mediated ADCC against HSV-1+ targets, or the clinical course of HSV-1 infection.

Conclusions

A series of polymorphic key regulators of cytotoxic lymphocytes response such as KIR, CD16A, IgG1 and HLA class I, but not NKG2C CNV, modify the clinical course of HSV-1 infection. Conversely, HLA class II and CD32 genetic variation, controlling T-B lymphocyte collaboration and phagocytosis do not contribute significantly to the outcome of the herpetic infection.

1. EL VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1

1.1. El curso clínico de la infección por HSV-1

El virus Herpes simple tipo 1 (HSV-1) infecta a la mayoría de los individuos en edades tempranas, manteniéndose en estado latente en sus ganglios sensitivos durante toda la vida. La primoinfección requiere un contacto directo entre la piel o las mucosas dañadas de un individuo no infectado con viriones infectivos liberados en los fluidos corporales de un sujeto infectado. Esta infección primaria suele pasar desapercibida o causar sintomatología típica de una infección viral leve. Sin embargo, en casos excepcionales, puede ser la causa de enfermedades graves y potencialmente letales como la encefalitis herpética, el síndrome séptico por HSV-1, la infección congénita, el eczema herpeticum o la queratitis herpética (Abel et al, 2010; Chase et al, 1987; Frederick et al, 2002; Leung et al, 2013, Liesegang et al, 2001; Whitley et al, 1991).

El paso del virus a través de las barreras anatómicas de un individuo no infectado es seguido por la replicación viral en el sitio de la inoculación. A continuación, los viriones entran en las fibras nerviosas sensitivas y son transportados hacia los cuerpos neuronales en los ganglios sensitivos, donde se mantienen en estado latente. Algunos desencadenantes (como la exposición a radiaciones UV, el estrés o la fiebre), mediante mecanismos todavía no esclarecidos, pueden causar la reactivación de la replicación viral en las neuronas, seguida por el transporte de los viriones hacia el sitio de la primoinfección. Las reactivaciones pueden limitarse a la excreción asintomática de virus o, por el contrario, acompañarse de lesiones vesiculares y posteriormente ulcerativas que duran aproximadamente una semana. Las recurrencias clínicas se producen a intervalos muy variables, desde más de una al mes a una única reactivación a lo largo de toda la vida. Suelen afectar a la zona perioral y, menos frecuentemente, pueden involucrar la piel de cualquier otra zona o las mucosas gingival, bucal, labial, genital u ocular. Entre las formas clínicas complicadas cabe destacar la encefalitis herpética del adulto, la queratitis herpética y la afectación visceral en pacientes inmunocomprometidos (Whitley et al, 1998). Mientras que la encefalitis herpética, una de las formas clínicas más graves de la infección por HSV se desarrolla en un número extremadamente limitado de los sujetos infectados, el herpes ocular es la tercera afectación más frecuente (después del herpes labial y genital) y puede cursar con conjuntivitis, blefaritis, queratitis, uveítis o retinitis, siendo la queratitis herpética estromal la principal causa de ceguera de naturaleza infecciosa en los países desarrollados (Arduino et al, 2008; Liesegang et al, 2001; Pepose et al, 2006; Whitley et al, 1998).

1.2. Estructura del HSV-1

Por sus características morfológicas y biológicas el HSV-1, cuyo nombre formal es *Herpesvirus humano 1*, se clasifica dentro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* (genero *Simplexvirus*). Es un virus grande, con un diámetro aproximado de 150-200 nm, esférico, compuesto por una única doble cadena de ADN lineal recubierta por una cápside icosaédrica, que a su vez está envuelta en una membrana externa lipoproteica; la envuelta viral se une a la nucleocápside a través del tegumento (**Figura 1A**). El genoma del HSV-1 tiene la estructura más compleja de la familia; sin embargo, por su tamaño se clasificaría entre los *Herpesviridae* como intermedio-corto. Contiene aproximadamente 150.000 pares de bases, incluyendo más de 80 genes organizados en dos segmentos, denominados, en función de su tamaño, largo (L, *long*) y corto (S, *short*). Cada uno de estos segmentos contiene regiones únicas (U_L y U_S , respectivamente) flanqueadas por secuencias repetitivas (TR_L/IR_L y TR_S/IR_S , respectivamente) (Wadsworth et al, 1975, **Figura 1B**). La nomenclatura de los genes del HSV-1 se basa en su orden, de 5' a 3', en cada una de estas regiones (p.ej U_{L41} o U_{S11}).

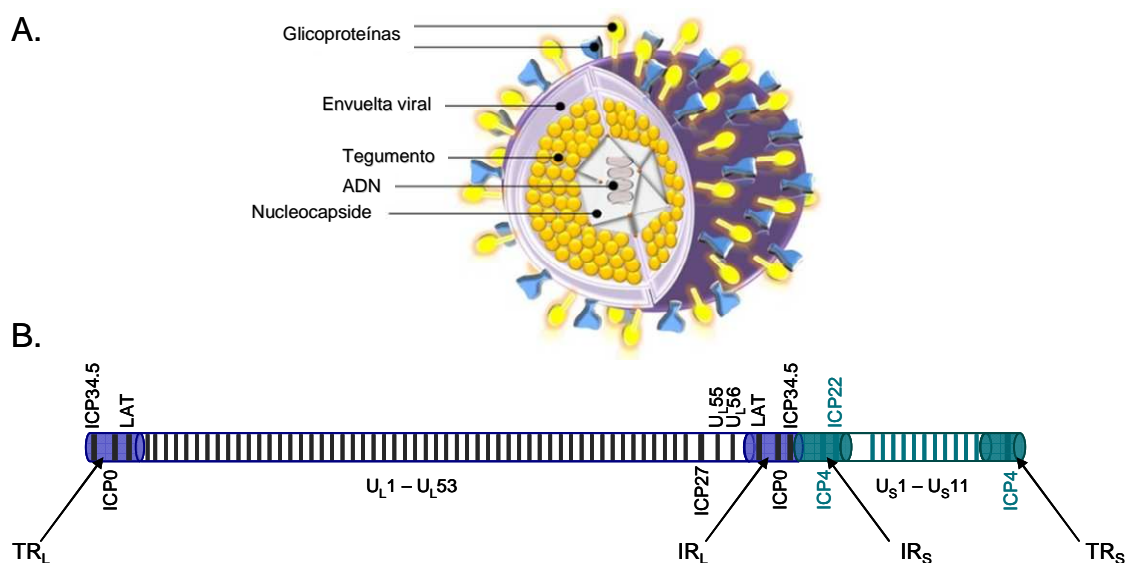


Figura 1. Estructura del HSV-1 y organización de su genoma. (adaptado de Elbadawy et al, 2012 y Simonato et al, 2000). El tamaño de cada gen y de los espacios intergenicos es arbitrario.

1.3. Estadios de la infección productiva

La infección productiva (o activa) empieza con la entrada del virus en la célula hospedadora y es seguida por la expresión de proteínas virales, la replicación del ADN viral, el ensamblaje del virión y, finalmente, su salida de la célula. Las glicoproteínas

virales B (gB), gC, gD, gH y gL están implicadas, de diferente manera, en la entrada del virus en la célula hospedadora. Así, gC facilita la adhesión del virus a la membrana plasmática, siendo este proceso estabilizado por gD y algunas proteínas de membrana conocidas como receptores para la entrada de Herpesvirus (Hve) (Spear et al, 2000). El siguiente paso es la fusión de la envuelta viral con la membrana celular, mecanismo en el que participan gD y gB, así como el complejo gH/gL. Tras la fusión, la nucleocápside y algunas proteínas del tegumento se liberan en el citoplasma y, finalmente, la cápside es transportada al núcleo, donde se inicia la transcripción génica.

La transcripción de los genes del HSV-1 sigue una secuencia temporal, dentro de la que se distinguen tres grupos de genes: los muy tempranos (*IE*, *immediate early* o α), los tempranos (*E*, *early* o β) y los tardíos (*L*, *late* o γ). Los primeros genes que se transcriben (*IE*) no requieren síntesis previa de proteínas virales, ya que utilizan mecanismos de transcripción de la propia célula infectada. Sin embargo, algunas proteínas virales, como la VP16 (codificada por *UL47*), favorecen esta actividad de los factores de transcripción celulares ya ensamblados en los promotores de los genes *IE* (Taylor et al, 2002). A su vez, las proteínas virales codificadas por los genes *IE* inician la transcripción de los genes tempranos y algunos tardíos, llamados tardíos iniciales o γ_1 . Los genes tardíos verdaderos o γ_2 se transcriben solo después del inicio de la replicación viral.

El ADN viral linear se circulariza al pasar al núcleo. La duplicación del ADN viral se inicia a partir de uno de los tres orígenes de replicación del genoma del virus, generando muchos genomas virales nuevos en cada célula infectada. El ensamblaje de la nucleocápside tiene lugar también en el núcleo de la célula infectada y requiere la síntesis de varias proteínas virales tardías. Las cápsides vacías maduras se cargan con ADN viral recién sintetizado y salen del núcleo hacia el espacio perinuclear, proceso durante el cual adquieren envuelta viral y varias proteínas del tegumento. El modelo de salida de los viriones más ampliamente aceptado implica su fusión con la membrana nuclear externa y la liberación de la nucleocápside al citoplasma, seguida por la re-adquisición de la envuelta viral en el Golgi y su secreción a través de una vía de transporte vesicular. Alternativamente, los viriones saldrían del espacio perinuclear en vesículas o a través del retículo endoplasmico hacia el Golgi, y serían transportados fuera de la célula por vías exocíticas o secretorias (Campadelli-Fiume, 2007; Taylor et al, 2002).

1.4. La infección latente

Una característica de los Herpesvirus es su capacidad de establecer una infección latente, que persiste a lo largo de toda la vida del individuo. Esta latencia se define clásicamente como la retención del genoma completo del virus sin que haya producción de viriones infectivos. Sin embargo, pese a la falta de una infección productiva, durante el estado latente hay expresión, si bien limitada, de algunos transcritos y proteínas virales (Derfuss et al, 2007; van Veltzen et al, 2013). Aunque todavía se desconoce el mecanismo responsable del mantenimiento del estado latente en las neuronas, se han realizado avances relevantes para su esclarecimiento.

En este sentido, se ha propuesto que ciertas diferencias entre el sistema transcripcional de las neuronas y otros tipos celulares con capacidad proliferativa, como la localización preferentemente citoplasmática del factor de transcripción HCF (*Host Cell Factor*), limita su función sobre los genes *IE* (Preston y Efstathiou, 2007). Otras teorías se refieren a que la proteína del tegumento VP16 puede que no llegue al cuerpo neuronal junto con el genoma viral, o que no sea funcional, limitando igualmente la transcripción de los genes *IE* (Kristie y Roizman, 1988; Preston y Efstathiou, 2007).

Los RNA virales más abundantes en las neuronas infectadas pertenecen a una familia de transcritos denominados LAT (*Latency Associated Transcripts*), codificados en las regiones repetitivas que flanquean la región U_L (**Figura 1B**). Aunque no se ha demostrado expresión de proteínas codificadas por LAT y la presencia de estos transcritos no es imprescindible para el estado de latencia, se les ha implicado en su modulación. Así, las observaciones de que una parte de sus secuencias solapan con la de los genes *IE* que codifican ICP0 e ICP4 y de que se transcriben en sentido contrario, han llevado a la hipótesis de que la presencia de LAT bloquea la expresión de estas proteínas, impidiendo así la infección productiva (Chen et al, 1997). Apoyando esta hipótesis, varios estudios han demostrado presencia de RNA derivado de estos genes *IE* (pero no de proteínas) en neuronas procedentes de ganglios trigeminales humanos y murinos (Derfuss et al, 2007; Kramer et al, 1995; Theil et al, 2003). Una teoría alternativa sobre el papel de los LAT en el mantenimiento de la latencia es su capacidad de promover la supervivencia de las neuronas infectadas limitando su apoptosis (Perng et al, 2000).

La hipótesis mas ampliamente aceptada sobre la reactivación del virus implica que los promotores virales y, en particular, el de la ICP0, no están completamente bloqueados sino inactivos. Estos promotores podrían activarse en respuesta a ciertos estímulos, desencadenando así las reactivaciones (Preston y Efstathiou, 2007). Alternativamente,

se ha propuesto un modelo dinámico de reactivación, en el que existe una producción de viriones infectivos continua pero a bajos niveles, controlada estrechamente por el sistema inmunitario del hospedador y acompañada solo esporádicamente de sintomatología clínica (Wald et al, 1997). La liberación sorprendentemente frecuente de viriones infectivos en las secreciones de sujetos asintomáticos apoya esta última hipótesis.

2. LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A HSV-1

El hecho de que la inmunosupresión, farmacológica o patológica, aumente el riesgo de sufrir cuadros herpéticos de mayor trascendencia apoya el papel clave de la respuesta inmunitaria en el control del HSV-1, tanto durante la primoinfección como en las reactivaciones. Al resultado de la interacción entre el virus y su hospedador contribuyen factores genéticos y ambientales, manifestándose como susceptibilidad o resistencia a la enfermedad. Tanto las respuestas inmunitarias innatas como las adaptativas convergen para controlar la infección inicial y sus reactivaciones. Variantes que modifiquen la intensidad de cualquiera de estos mecanismos podrían influir en la probabilidad de sufrir una infección clínicamente manifiesta o asintomática.

2.1. Producción de citoquinas en respuesta a patrones moleculares virales

El desencadenante de cualquier respuesta inmunitaria frente a un microorganismo es el reconocimiento de su presencia. Para ello, el hospedador dispone de varios tipos de receptores expresados en diferentes estirpes celulares. Entre los sensores de la inmunidad innata están varias familias de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que se unen a motivos constitutivos y conservados de diferentes patógenos (PAMPs) desencadenando respuestas tempranas en presencia de microorganismos. La expresión de los diferentes PRRs en distintos compartimentos celulares y, por lo general, en más de un subtipo celular, junto con la presencia de más de un PAMP en la mayoría de los microorganismos, permiten una respuesta adecuada y coordinada frente a virtualmente cualquier tipo de patógeno. Su activación da lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias, el reclutamiento de otras células implicadas en la respuesta inmunitaria innata y, finalmente, la activación de una respuesta adaptativa y el control de la infección.

Se han caracterizado interacciones entre varias estructuras del HSV-1 y diferentes PRR. Así, el receptor de membrana TLR2 (*Toll-like Receptor*) reconoce la glicoproteína viral gB y el complejo gH/gL (Cai et al, 2012; Leoni et al, 2012) y los receptores endosomales TLR3 y TLR9 se activan en respuesta a dsRNA derivado de

HSV-1 y ADN no metilado con islas CpG, respectivamente (Rasmussen et al, 2007; Zhang et al, 2007). Además, varios sensores de ADN citosólicos, entre ellos RIG-1 (*Retinoic acid-inducible gene 1*) y MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*), reconocen también estructuras intracelulares derivadas de HSV-1 (Melchjorsen et al, 2010; Paludan et al, 2013; Rasmussen et al, 2009; Unterholzner et al, 2013).

Las vías de activación celular de los PRRs que reconocen estructuras del HSV-1 convergen en respuestas proinflamatorias, sobre todo la producción de interferones (IFN). Los IFNs de tipo I y III (IFN- α/β e IFN- λ , respectivamente) son producidos en las primeras horas después de la infección por una amplia gama de células, incluyendo las células epiteliales infectadas y las células dendríticas. El IFN- γ , en cambio, se secreta en un paso posterior de la respuesta inmunitaria, principalmente por los linfocitos NK y T (Durbin et al, 2013). Los interferones, ampliamente aceptados como primera línea de defensa frente a las infecciones virales, bloquean la replicación viral y controlan la transcripción de varios genes en la célula hospedadora, generando un estado de represión global de la síntesis de proteínas. Además, promueven la producción de otras citoquinas y potencian la presentación antigénica, modulando así la respuesta inmunitaria adaptativa frente al HSV-1 (Pollara et al, 2004). Especialmente relevante es la potenciación de la producción de la IL-15, puesto que, a su vez, esta citoquina estimula la proliferación y citotoxicidad de las células NK y de los linfocitos T CD8+, efectores celulares clave en el control de las infecciones virales (Mattei et al, 2001; Musso et al, 1999; Ogasawara et al, 1998).

Asimismo, la producción de otras citoquinas (y quimioquinas) proinflamatorias tras la activación de los PRRs parece ser igualmente importante en el control de la infección herpética. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , producido principalmente por monocitos, macrófagos, linfocitos T y células NK, actúa de manera sinérgica con el IFN- γ y muestra efectos tanto protectores como inmunopatogénicos en diferentes modelos de infección por HSV (Aravalli et al, 2005; Bryant-Hudson et al, 2014; Ghiasi et al, 1995; Keadle et al, 2000; Kodukula et al, 1999; Lundberg et al, 2007; Sergerie et al, 2007).

Mutaciones que predisponen al desarrollo de la encefalitis herpética (HSE) confirman el papel clave de los IFNs y del reconocimiento de PAMPs en la defensa frente a HSV-1. Varias mutaciones autosómicas dominantes y recesivas en genes que codifican proteínas de la vía de activación TLR3 – IFN-I predisponen a sufrir cuadros aislados de HSE. En concreto, se han descrito más de 10 casos de pacientes con mutaciones en el propio *TLR3*, en *UNC93B1* y en los genes que codifican TRAF3 (*TNF receptor associated factor 3*), TRIF/TICAM1 (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) y TBK1 (*TANK-binding kinase 1*, una proteína del complejo NF- κ B),

siendo todas ellas proteínas que participan en la señalización a través de TLR3, TLR7 y TLR9 (Casrouge et al, 2006; Guo et al, 2011; Herman et al, 2012; Perez de Diego et al, 2011; Sancho-Shimizu et al, 2011a; Zhang et al, 2007). Además, una minoría de pacientes con otras inmunodeficiencias, como las causadas por mutaciones en *NEMO* (*NF-κB Essential Modulator*) y *STAT1* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), que afectan a la señalización a través de NF-κB y a la respuesta a IFN-I, también desarrolla HSE (Bustamante et al, 2008; Sancho-Shimizu et al, 2011b). Por tanto, la vía de activación TLR3 – IFN-I en respuesta a HSV-1 parece fundamental para la protección frente la primoinfección, al menos en el sistema nervioso central. Queda por demostrar en qué medida el reconocimiento del HSV-1 a través de TLR3 y otros PRRs también condicionaría las recurrencias.

2.2. Moléculas polimórficas en la interfaz entre la respuesta inmunitaria innata e adaptativa

2.2.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad

Características estructurales de las moléculas HLA

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) fue descubierto inicialmente en el ratón, por su papel en la compatibilidad tisular entre individuos de la misma especie (Snell, 1953). Las moléculas del MHC humanas (*human leucocyte antigens*, HLA) son glicoproteínas de membrana especializadas en la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T. En función de sus características estructurales y funcionales, se distinguen dos grandes clases, denominadas I y II. Las moléculas HLA de clase I clásicas, que se expresan en prácticamente todas las células nucleadas, presentan péptidos derivados de proteínas intracelulares a los linfocitos T CD8+, mientras que las moléculas HLA de clase II se expresan casi exclusivamente en células presentadoras de antígenos (APC) y son capaces de presentar péptidos derivados de antígenos de origen extracelular a los linfocitos T CD4+ (Neefjes et al, 2011). Además de las moléculas HLA de clase I clásicas, o de clase Ia, se han identificado varias otras no-clásicas, con características estructurales similares, pero que difieren de las primeras en cuanto a su reducida variabilidad genética, su distribución tisular y su función, en algunos casos todavía desconocida.

Las moléculas HLA de clase I clásicas están formadas por una glicoproteína integral de membrana (cadena pesada o cadena α) unida de manera no covalente a la β_2 -microglobulina (cadena ligera o cadena β). La cadena pesada presenta tres dominios extracelulares globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), un fragmento transmembrana y una región intracitoplasmática corta. Una estructura similar se observa en las moléculas HLA de

clase II, aunque estas están formadas por dos cadenas polipeptídicas transmembrana de tamaño similar, α y β , cada una con dos dominios extracelulares globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$). Mientras que los dominios más próximos a la membrana de cada heterodímero HLA son esencialmente invariantes y adoptan una conformación de tipo dominio de inmunoglobulina, los dominios externos albergan gran parte del polimorfismo de estas moléculas y tienen una conformación más compleja, que genera el sitio de unión de péptidos antigénicos cuya base está formada por láminas β y los bordes externos por helices α (**Figura 2**). Pequeñas diferencias estructurales entre las moléculas HLA de clase I y II condicionan el tamaño de los fragmentos peptídicos que pueden alojar; así, el sitio de unión de péptidos formado por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada de las moléculas HLA de clase I acomoda fragmentos peptídicos cortos, de 8-11 aminoácidos, mientras que el de las moléculas HLA de clase II, constituido por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, permite la unión de péptidos de tamaño mayor y algo más variable, habitualmente de 13-25 aminoácidos.

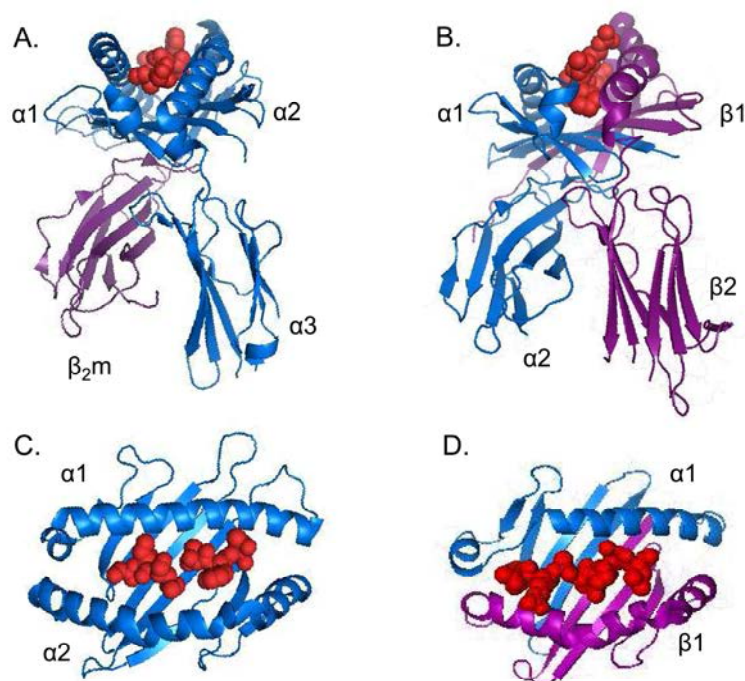


Figura 2. Estructura de las moléculas HLA de clase I y clase II.

A, B visión lateral del fragmento extracelular de moléculas HLA de clase I (A, HLA-A2, pdb 1B0R) y II (B, HLA-DR4, pdb 1D5Z). C, D visión superior del sitio de unión de péptidos antigénicos de una molécula HLA de clase I (C) y II (D).

Procesamiento y presentación antigénica

Los péptidos presentados por las moléculas HLA se generan en diferentes compartimentos intracelulares. Las proteínas presentes en el citoplasma de una célula (ya sean de origen propio o extraño) se degradan de forma controlada en el proteasoma. Los péptidos generados son a continuación transportados activamente a la luz del retículo endoplásmico a través del transportador de péptidos antigénicos (TAP). Aquí, las moléculas HLA de clase I previamente ensambladas se cargan con péptidos y maduran su estado conformacional, siendo transportadas vía Golgi hacia la membrana plasmática. El correcto ensamblaje y la carga con péptidos de las moléculas HLA de clase I dependen de un complejo multiproteico que incluye TAP, tapasina y otras chaperonas. La tapasina facilita la co-localización de las moléculas HLA vacías junto al TAP, estabiliza la conformación libre de péptidos de las moléculas HLA y optimiza su repertorio de péptidos, favoreciendo a aquellos de alta afinidad (Chen et al, 2007; Williams et al, 2002). Existe, sin embargo, un mecanismo alternativo de presentación de péptidos antigénicos independiente de la tapasina, pero este proceso es subóptimo y restringido a un número limitado de variantes alélicas de las moléculas HLA de clase I (Rizvi et al, 2014; Thammavongsa et al, 2006; Williams et al, 2002).

La presentación antigénica de péptidos derivados de proteínas extracelulares (procedentes de microorganismos extracelulares, partículas virales u otras proteínas antigénicas solubles) por parte de moléculas HLA de clase II requiere su transporte hacia el interior de la célula mediante fagocitosis o endocitosis. Estos procesos generan vesículas intracelulares en las que, tras fundirse con los lisosomas, las proteínas internalizadas son degradadas mediante procesos enzimáticos. Las moléculas HLA de clase II que han sido transportadas a través del retículo endoplásmico y el Golgi a estas vesículas se cargan con los péptidos resultantes mediante un proceso muy complejo tras en cual son finalmente transportadas hacia la membrana plasmática.

Polimorfismo genético del MHC

El MHC en humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y es el locus más polimórfico y con mayor densidad de genes del genoma. El MHC abarca ~4 Mpb y está organizado en tres regiones. En la región telomérica se sitúan los genes que codifican las distintas cadenas pesadas de las moléculas HLA de clase I, mientras que en la zona más próxima al centrómero están los genes que codifican las cadenas α y β de las moléculas HLA de clase II junto con varios otros genes implicados en el procesamiento y presentación antigénica. Ninguno de los productos génicos de la

zona central, denominada región de “clase III”, son moléculas del sistema HLA, si bien incluye genes que codifican proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria e incluso con el procesamiento antigénico (**Figura 3**). Por último, la β_2 -microglobulina, está codificada en el cromosoma 15, fuera del locus MHC.

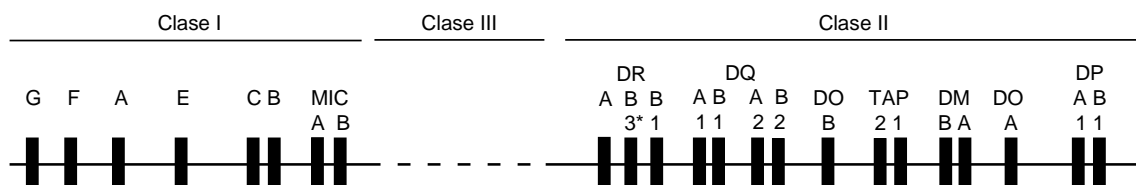


Figura 3. El locus MHC humano. En el locus *DR* se ha representado una de las posibles combinaciones de genes. *El gen *DRB3* puede estar reemplazado por *DRB4* o *DRB5*. Los pseudogenes no están representados. Las distancias entre los genes son arbitrarias.

A diferencia de las inmunoglobulinas y de los receptores de los linfocitos T (TCR), las moléculas HLA están codificadas por genes estables que no se reordenan ni tampoco sufren otros procesos somáticos; su variabilidad viene dada por el número amplio de genes y el polimorfismo de varios de ellos. Lo que distingue el polimorfismo del MHC del de otros loci es el gran número de diferencias entre los distintos alelos (hasta 50 aminoácidos diferentes) y la similitud entre las frecuencias de muchos de estos alelos. En el caso de las moléculas HLA de clase I, el polimorfismo se limita a los genes que codifican la cadena pesada, teniendo el locus B el mayor número de alelos (3887 descritos hasta junio de 2015), seguido por el locus A y el C (Robinson et al, 2015). En lo que respecta a los genes que codifican las moléculas HLA de clase II, el más variable es el locus *DRB1* (que codifica la cadena β de la molécula), careciendo el locus *DRA* casi por completo de variantes alélicas (Robinson et al, 2015). La generación de esta enorme diversidad es el resultado de procesos de recombinación en el contexto de una gran cantidad de mutaciones (Parham y Ohta, 1996; Trowsdale, 2011).

El amplio número de alelos para muchos de los genes HLA ha hecho necesaria la elaboración de una nomenclatura específica (WHO, 1968; Bodmer et al, 1988; Marsh et al, 2010). Actualmente, a la letra que define cada locus le sigue un asterisco y a continuación una secuencia numérica específica para cada alelo, de hasta cuatro grupos de dígitos (p. ej. *HLA-A*01:01:01:01*). El primer grupo de números corresponde a la designación de un antígeno HLA y el segundo grupo a una variante alélica que se distingue por al menos un cambio de aminoácido. Los siguientes grupos de dígitos designan diferencias en la secuencia que no afectan a la proteína; así, el tercer grupo

designa sustituciones sinónimas, mientras que el cuarto abarca polimorfismos en la secuencia de las regiones no codificantes.

Como se ha mencionado previamente, el polimorfismo HLA se concentra en los dominios que interaccionan con los péptidos y el TCR, determinando las secuencias de los péptidos que pueden alojar. Análisis exhaustivos de las secuencias peptídicas que albergan moléculas HLA concretas han establecido que solamente algunos de sus residuos son iguales (o muy similares). Así, en el caso de las moléculas HLA de clase I, el segundo y el noveno aminoácidos de los péptidos que se unen a un determinado alelo son muy parecidos y se acomodan en unos bolsillos generados en el sitio de unión de antígenos (Falk et al, 1991). De esta manera, cada molécula HLA puede presentar un gran abanico de péptidos, que, sin embargo, no es ilimitado. Además, el procesamiento de las proteínas para la generación de péptidos antigénicos depende de otros factores como la posibilidad de que se produzca un corte enzimático o la probabilidad de paso a través del TAP en el caso de las moléculas HLA de clase I. Todos estos factores contribuyen a la generación de un repertorio único, más o menos amplio, de péptidos antigénicos para cada una de las moléculas HLA de un individuo, ofreciendo una gran diversidad de antígenos para una respuesta T adecuada.

El papel del MHC en la salud humana

La enorme variabilidad del sistema HLA y sus particularidades ya mencionadas indican que su evolución ha estado condicionada por fuertes presiones de selección. Desde mediados del siglo XX, se ha postulado un papel clave de los patógenos en la generación y mantenimiento de este gran polimorfismo genético (Haldane, 1949), y, aunque apoyada por escasas evidencias experimentales, esta teoría sigue siendo la más ampliamente aceptada. Así, diferentes procesos selectivos favorecerían la supervivencia de individuos heterocigotos (sobredominancia), ya que estos tendrían más posibilidades de presentar péptidos antigénicos derivados del agente patógeno causante de una enfermedad. De manera similar, variantes alélicas raras, que confieren protección a un cierto patógeno, aumentarían su frecuencia por un proceso de selección positiva (Parham y Ohta, 1996).

Por tanto, no es sorprendente que la presencia de ciertas moléculas HLA se haya relacionado con la susceptibilidad a varias enfermedades infecciosas. De ellas, una asociación bien documentada es la infección por HIV, en la que se han establecido papeles fundamentales en el progreso de la infección para ciertos aminoácidos del sitio de unión de péptidos de las moléculas HLA-B, los niveles de expresión de HLA-C

y la dependencia de la tapasina para la carga peptídica de las moléculas HLA de clase I (Carrington, 2012; Rizvi et al, 2014).

La contribución de la diversidad genética del sistema MHC a la salud humana no se limita al control de las enfermedades infecciosas. De hecho, el locus MHC es la región del genoma humano más frecuentemente asociada a la susceptibilidad a enfermedad (Tiwari y Terasaki, 1985). Más de cien enfermedades han sido asociadas al MHC, con un rango de significación estadística muy amplio, incluidas ciertas neoplasias, enfermedades neurológicas como la narcolepsia o la esquizofrenia, pero sobre todo muchas enfermedades autoinmunes (Trowsdale, 2011). La asociación del MHC con el desarrollo de las enfermedades autoinmunes podría explicarse por la presentación preferente de ciertos péptidos propios por moléculas HLA concretas. Esta pérdida de la tolerancia frente a lo propio podría guardar relación con modificaciones postraduccionales de ciertos epítomos, o con el fenómeno de mimetismo molecular (Caillat-Zucman, 2008).

2.2.2. Receptores de células NK para HLA de clase I

Las células NK son linfocitos con capacidad citolítica y secretora de citoquinas con un papel clave en el control de las infecciones virales y los procesos neoplásicos. Reconocen principalmente patrones de expresión molecular alterados por la presencia de patógenos, de los que un ejemplo es la expresión anormalmente baja de moléculas HLA de clase I (Lanier, 2005). Los receptores implicados en el reconocimiento de las moléculas HLA pertenecen a las familias de receptores KIR (*Killer-cell Ig-like Receptors*), LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor family*, en concreto LILRB1) y CD94/NKG2, e incluyen tanto receptores inhibidores como activadores. Mientras que el papel de los receptores inhibidores para HLA se explicaría por la hipótesis del “*missing self*”, según la cual la falta de su ligando desencadena una respuesta citotóxica de las células NK que los expresa (Kärre, 1986), el papel de los receptores activadores para HLA sigue siendo un tema de investigación abierto.

La expresión de estos receptores en las células NK es clonal, y esta expresión variegada contribuye al proceso de maduración de las células NK conocido como educación. Según los diferentes modelos propuestos para explicar la educación de las células NK, solamente los clones de células NK que reconocen HLA propio a través de receptores inhibidores serán funcionales, y su nivel de activación dependerá de la señal neta recibida o, en otras palabras, del número de receptores para MHC que expresa y de la intensidad de su interacción con sus ligandos (Anfossi et al, 2006; Brodin et al, 2009; Fauriat et al, 2010; Joncker et al, 2009; Kim et al, 2005). En analogía con el

desarrollo de los linfocitos T, la educación a través de receptores para MHC inhibidores sería comparable con la selección positiva, y la ejercida por los receptores activadores, con la selección negativa, siendo una diferencia fundamental el hecho de que en el caso de las células NK, esta selección no implica la muerte o la supervivencia de los diferentes clones sino que afecta a su funcionalidad (es decir, condiciona la activación o la anergia de estos clones en presencia de células que expresan sus ligandos).

La expresión de estos receptores para HLA de clase I no está restringida a las células NK. Una pequeña subpoblación de linfocitos T, sobre todo CD8+, expresa también este tipo de receptores y, si bien su contribución al control de la activación de estas células no se conoce en detalle, se les atribuye igualmente un papel modulador de su actividad citolítica (TCR-dependiente) en presencia de moléculas propias (van Bergen y Koning, 2010; Vivier y Anfossi, 2004).

2.2.2.1. Los receptores KIR (Killer-cell Ig-like Receptors)

Estructura de los KIR

Los KIR son glicoproteínas de membrana de tipo I pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esta familia está formada por 14 miembros e incluye receptores activadores, inhibidores y algunos con función incierta (Lanier, 2005). En base a su estructura, se distinguen KIR con 2 o 3 ectodominios tipo inmunoglobulina y con un fragmento intracitoplasmático largo o corto (**Figura 4**).

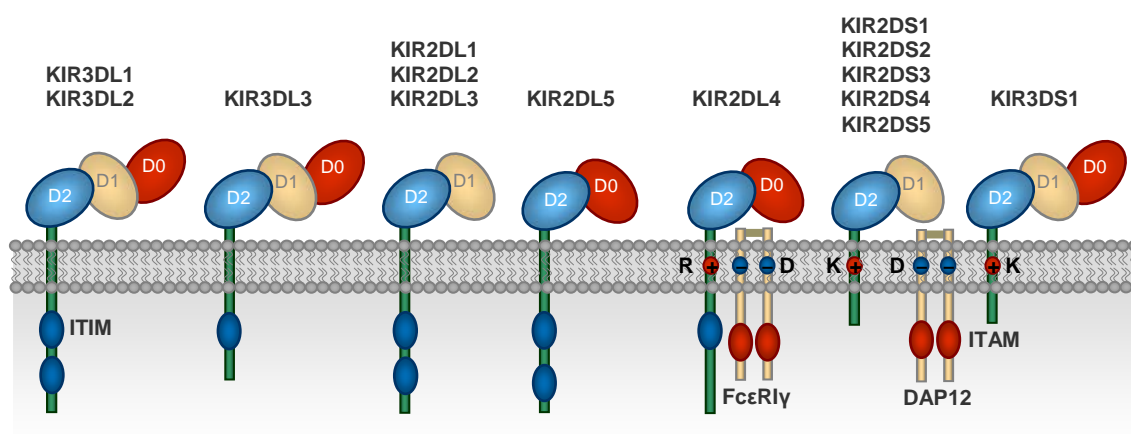


Figura 4. Estructura de los KIR.

Todos los KIR inhibidores tienen una región citoplásmica larga (de 76 a 115 aminoácidos) que incluye uno o dos motivos ITIM. En cambio, el fragmento citoplasmático de los KIR activadores es corto (20-30 aminoácidos), carece de ITIM y

su región transmembrana contiene un residuo básico de lisina que les permite unirse a la molécula adaptadora DAP12. Hay además dos excepciones a esta regla; el receptor KIR3DL3 tiene un fragmento citoplasmático de longitud intermedia y un solo ITIM (Torkar et al, 1998), y KIR2DL4 tiene un fragmento intracelular con un ITIM y un residuo básico de arginina en su región transmembrana, que le permitiría transmitir señales intercelulares tanto activadoras como inhibidoras (Rajagopalan y Long, 1999).

La nomenclatura de los KIR se rige por las diferencias estructurales (Marsh et al, 2003); así, el número que sigue al acrónimo KIR se corresponde con el de los dominios tipo inmunoglobulina, y es seguido por la letra “D”, de dominio. La siguiente letra se refiere a la longitud del fragmento intracelular (L, largo, o S, corto, de *short*) y el último número se corresponde al número del gen que codifica un KIR con esta estructura. Siguiendo estas reglas, por ejemplo, KIR2DS1 y KIR2DS5 son KIR activadores con dos dominios tipo inmunoglobulina y cola citoplasmática corta, mientras que KIR3DL2 es un receptor inhibidor con tres dominios tipo inmunoglobulina y región citoplasmática larga.

El complejo KIR

El complejo de genes *KIR* en humanos está localizado en el locus *LRC* (*Leukocyte Receptor Complex*), en el cromosoma 19 (19q13.4, Wilson et al, 2000). El complejo *KIR* incluye combinaciones de 15 genes y dos pseudogenes (*KIR2DP1* y *KIR3DP1*) dispuestos en tándem (Vilches y Parham, 2002). Además, fuera del complejo *KIR*, hacia 5' en el *LRC* se encuentra otro pseudogén, *KIR3DX1* (Sambrook et al, 2006). Una característica importante de esta región del genoma es la gran variabilidad del número de copias de cada gen *KIR*; así, con mucha frecuencia se encuentran individuos sanos cuyo genoma incluye genes para solamente siete KIR y otros con genes *KIR* que codifican hasta 15 receptores diferentes. Además, en un mismo cromosoma puede haber cero, uno, dos o incluso más genes *KIR* que codifiquen el mismo receptor. Este fenómeno se debe a una serie de recombinaciones, duplicaciones y deleciones que ha sufrido este locus durante la evolución, procesos que han sido favorecidos por la alta similitud entre las secuencias de los distintos genes *KIR*, su orientación idéntica y las cortas regiones intergenicas (Pyo et al, 2010).

Los genes *KIR*, de manera similar a los genes del complejo MHC, se heredan en bloques o haplotipos. Un atributo muy característico de los haplotipos *KIR* es la variabilidad del contenido génico. Salvo cuatro genes conservados en casi todos los individuos, la frecuencia del resto varía considerablemente en la población. De esta manera, en cada haplotipo *KIR* hay genes que están casi siempre presentes,

delimitando dos zonas, telomérica y centromérica, dentro de las que puede haber un número y tipo variable de genes *KIR* (**Figura 5**). En función de su contenido génico, se distinguen dos grupos de haplotipos *KIR*, A y B. El haplotipo A es el más frecuentemente encontrado e incluye los genes *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* y *KIR3DL2*. Cualquier variación en exceso en esta dotación génica respecto al haplotipo A se considera un haplotipo B. En base a esto, se puede asignar un genotipo *KIR* AA a todos aquellos individuos en cuyo genoma solamente se encuentran genes *KIR* incluidos en el haplotipo A. Los sujetos carentes de cualquier gen *KIR* incluido en el haplotipo A tendrían un genotipo *KIR* BB. El resto, a los que en base al contenido génico del complejo *KIR* no se les puede asignar un genotipo AA o BB, tendrían un genotipo BX. Se observa, por tanto, que la mayor heterogeneidad génica de los haplotipos B hace que los individuos con genotipos BB o BX tengan genes que codifican para varios KIR activadores e inhibidores. En cambio, los sujetos con un genotipo AA tienen solamente un gen que codifica para un KIR activador, *KIR2DS4*, que, en ~75% de los Caucasoides está representado por alelos que codifican receptores sin expresión en la membrana, debido a una delección de 22 pb en el exón 5 (Maxwell et al, 2004).

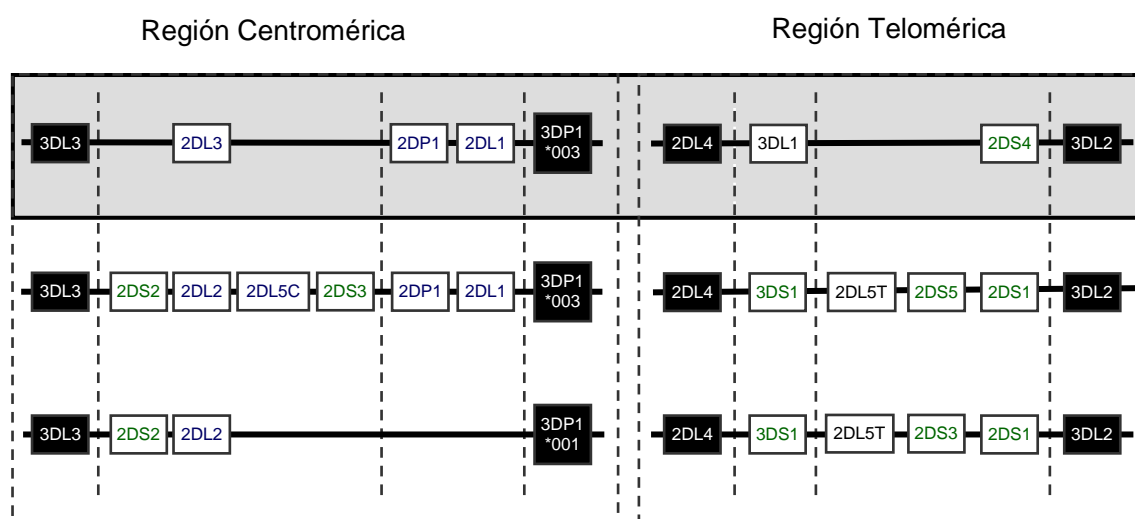


Fig 5. El complejo *KIR*. Organizaciones génicas del complejo *KIR* más comunes; un haplotipo *KIR* puede ser cualquiera de las combinaciones de una de las tres variantes de la región centromérica con otra telomérica. Los genes que codifican para KIR activadores están en verde; el haplotipo A está resaltado en gris. Los espacios intergénicos se han ampliado artificialmente para alinear genes homólogos.

Asimismo, el polimorfismo alélico del complejo *KIR* aumenta aún más su variabilidad genética. Algunas variantes alélicas de distintos genes *KIR* tienen implicaciones funcionales importantes (como la delección del gen *KIR2DS4* previamente mencionada,

mutaciones que impiden su expresión o variaciones que modifican la afinidad del receptor para su ligando) pero el significado funcional de la mayoría de estos polimorfismos es desconocido.

Ligandos y patrón de expresión de los KIR

El contenido génico variable del complejo *KIR* y el polimorfismo alélico condicionan el repertorio *KIR* de cada individuo. Pero además, mecanismos sólo parcialmente esclarecidos hacen que los diferentes clones de células NK expresen solo parte de los *KIR* de su genoma (Valiante et al, 1997). Esta expresión variegada está controlada epigenéticamente y determina la presencia de un amplio número de clones NK que expresan *KIR* diferentes que, por tanto, tienen una capacidad diferente para responder a diferentes estímulos y controlar individualmente la expresión de distintas moléculas HLA (Uhrberg, 2005). En este contexto, infecciones o procesos tumorales que bajan la expresión de moléculas HLA como mecanismo de protección frente a la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T, activarían a las células NK con receptores *KIR* inhibidores para estas moléculas HLA propias (según la hipótesis de *missing self*, o falta de reconocimiento de lo propio). La menor afinidad de los receptores activadores para sus ligandos HLA, comparada con los inhibidores que reconocen los mismos ligandos contribuyen a que clones de células NK que expresen estos receptores activadores no generen respuestas descontroladas frente a lo propio.

Durante las últimas décadas se han ido identificando ligandos de varios *KIR*, que, en su mayoría, son moléculas HLA y este reconocimiento es, en general, alotípico. De ellos, las mejor caracterizadas son las interacciones de *KIR* inhibidores con moléculas HLA-C y HLA-B (Vilches y Parham, 2002). Los alelos HLA-C con lisina en la posición 80 de la cadena α (epítipo HLA-C2) son reconocidos por *KIR2DL1* y, con menor afinidad, por *KIR2DS1*. En cambio, *KIR2DL2* y *KIR2DL3* reconocen, con diferente afinidad, alelos HLA-C con asparagina en la posición 80 (epítipo HLA-C1) aunque trabajos más recientes demuestran que esta preferencia no es absoluta, ya que estos receptores reconocen también algunos alelos HLA-C2 (David et al, 2013; Moesta et al, 2008; Pende et al, 2009; Schonberg et al, 2011; Winter et al, 1998). Los primeros estudios no encontraron afinidad alguna de *KIR2DS2* (el homólogo activador de *KIR2DL2*) para HLA-C (Moesta et al, 2010; Vales-Gómez et al, 1998; Winter et al, 1998), pero otros observan que *KIR2DS2* se une (con baja afinidad) a moléculas HLA-C1 y esta interacción es capaz de activar a las células NK *KIR2DS2*⁺*KIR2DL2*⁻ (David et al, 2013; Stewart et al, 2005). Inesperadamente, una publicación reciente encuentra que *KIR2DS2* se une también a HLA-A*11 (Liu et al, 2014).

KIR3DL1 reconoce alotipos HLA-A y HLA-B con el epítipo Bw4 (LRI/TXLR en los residuos 78-83 de la cadena pesada) (Gumperz et al, 1997); y KIR3DL2 se une a HLA-A*03 y HLA-A*11 (Pende et al, 1996). Un estudio mas reciente demuestra que KIR2DS4 reconoce algunos alelos HLA-A y HLA-C (Graef et al, 2009). Si bien existen indicios de que KIR3DS1 podría interactuar con alotipos HLA-B con isoleucina en la posición 80 de la cadena α , estas interacciones no han sido todavía demostradas formalmente (Alter et al, 2007; Carr et al, 2007; Martin et al, 2002). Por último, varios estudios apoyan que KIR2DL4 reconoce moléculas HLA-G (Ponte et al, 1999; Rajagopalan et al, 1999).

Más recientemente se ha descrito el reconocimiento de proteínas diferentes de las moléculas HLA por varios KIR. En concreto, KIR3DL2 (y en menor medida KIR3DL1, KIR3DS1 y KIR2DL4) puede unirse a patrones moleculares derivados de patógenos (PAMPs) como los oligonucleótidos CpG e internalizarlos para su reconocimiento por TLR9 en los endosomas (Sivori et al, 2010). Además, KIR2DL4 puede unirse a moléculas de heparán sulfato, interacción que podría tener un efecto modulador de la disponibilidad del receptor para unirse a ligandos proteicos (Brusilovsky et al, 2013 y 2014). Ambas interacciones podrían guardar relación con la alta carga positiva del dominio D0 de estos KIR, que ha sido directamente implicado en la unión de oligonucleótidos CpG y de heparán sulfato (Brusilovsky et al, 2013; Sivori et al, 2010).

Los KIR en la salud humana

Los KIR controlan el nivel de activación de las células NK en diferentes escenarios. La educación de las células NK, la variabilidad genética extrema de los KIR y de sus ligandos y la expresión variagada de los KIR generan un sistema muy complejo de regulación. El papel de este complejo sistema en la salud humana y sus posibles implicaciones en el control de varios procesos patológicos representa todavía un tema abierto de investigación.

Por ahora, la mayor parte de los datos disponibles proviene de estudios genéticos. Así, la presencia o ausencia de algunos *KIR* y de sus ligandos en el genoma han sido relacionadas con el control o el desarrollo de una serie de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas, así como con complicaciones en la reproducción humana (Khakoo y Carrington, 2006; Parham, 2005). En particular, el papel de los KIR en varias infecciones virales ha sido ampliamente estudiado, sobre todo a nivel genético.

La presencia de *KIR3DS1* y *KIR3DL1* en el genoma, junto con alelos HLA con el epítipo Bw4 con Ile en la posición 80 (Bw4^{80I}), se ha relacionado con un curso clínico de la infección por HIV favorable (Boulet et al, 2000; Martin et al, 2002; Martin et al, 2007). El efecto protector de KIR3DL1 se explicaría por su papel en la educación de las

células NK: la presencia de alelos *KIR3DL1* de alta expresión junto con su ligando permitiría el desarrollo de una amplia serie de clones de células NK con capacidad citolítica y altamente sensibles a pequeñas variaciones en la expresión de sus ligandos HLA inducidas por el patógeno (Carrington y Alter, 2012). En cambio, el efecto protector de *KIR3DS1* junto con Bw4^{80I} frente a la infección por HIV implicaría un mejor aclaramiento de las células infectadas mediado por las células NK *KIR3DS1*⁺ (Alter et al, 2007). Adicionalmente, la identificación de variantes alélicas de HLA-C con mayor expresión en la membrana que se correlacionan con la protección frente a la infección por HIV ha generado hipótesis que implican a los *KIR2D* que reconocen HLA-C en el control de la infección (Carrington y Alter, 2012). Por último, recientemente se ha relacionado a la presencia del alelo *KIR2DS4* funcional en el genoma con la patogenicidad de la infección crónica por HIV (Merino et al, 2014).

En la infección por el virus de la hepatitis C, algunos estudios han encontrado asociaciones significativas entre la presencia de *KIR2DS3* en el genoma y una mayor probabilidad de desarrollar una infección crónica (Dring et al, 2011; de Vasconcelos et al, 2013), mientras que otro estudio más reciente relaciona la presencia en el genoma de *KIR2DS3* (en ausencia de *KIR2DS5*) con bajos niveles de viremia (Kuśnierczyk et al, 2015). La falta de un ligando conocido para *KIR2DS3* dificulta la formulación de hipótesis que expliquen estos resultados.

Los KIR activadores podrían estar implicados también en el control de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). Así, la presencia en el genoma de haplotipos *KIR B* ha sido asociada al control de la infección (Cook et al, 2006; Di Bona et al, 2014; Stern et al, 2011) y en algunos individuos hCMV+ se ha observado una expansión de clones de células NK que expresan KIR activadores (Beziat et al, 2013; Della Chiesa et al, 2014).

En la infección por HSV-1, la presencia de *KIR2DL2* y *KIR2DS2* en el genoma ha sido relacionada con el desarrollo de recurrencias (Estefania et al, 2007), resultados que nos hemos propuesto replicar en el trabajo actual.

2.2.2.2. Los heterodímeros CD94/NKG2

Estructura y función

La familia de receptores NKG2 incluye varias glicoproteínas integrales de membrana de tipo II, pertenecientes a la superfamilia de las lectinas de tipo C: NKG2A/B, -C, -D, -E/H y -F. Su expresión está restringida a las células NK y algunos linfocitos T y, exceptuando NKG2D (el miembro de la familia más divergente filogenéticamente) y NKG2F, forman heterodímeros con CD94 (Lanier 2005; Lazetic et al, 1996). El procesamiento alternativo del ARNm de dos de los genes que codifican estos

receptores da lugar a las isoformas NKG2B y NKG2H, que son variantes de NKG2A y NKG2E, respectivamente, (Bellon et al, 1999; Plougastel et al, 1996). NKG2A/B, -C, y -E/H tienen una alta homología en su región extracelular (~95%). Sin embargo, el fragmento intracelular del receptor NKG2A/B es largo e incluye dos dominios ITIM transmitiendo, por tanto, señales inhibitoras, mientras que NKG2C y -E/H tienen región intracitoplasmática corta y una lisina en su fragmento transmembrana que les permite asociarse a DAP12 para señalización intracelular (Houchins et al, 1997; Lanier, 1998; Lopez-Botet et al, 1997). Si bien la capacidad de unirse a DAP12 les conferiría a priori funciones activadores, solamente se ha establecido claramente un papel de receptor activador para NKG2C (Cantoni et al, 1998; Muntasell et al, 2013).

Mientras que la expresión y la función de los heterodímeros CD94/NKG2A y CD94/NKG2C han sido ampliamente estudiadas (Aramburu et al, 1991; Cantoni et al, 1998; Lee et al, 1998a; Perez-Villar et al, 1995; Muntasell et al, 2013), debido principalmente a limitaciones técnicas se conoce mucho menos sobre el patrón de expresión y la funcionalidad de NKG2B, NKG2E y NKG2H. Una observación reciente indica que los complejos CD94/NKG2E/DAP12 están retenidos en el retículo endoplasmico, sugiriendo que puedan tener un papel en la regulación de la disponibilidad de ligandos para NKG2A o NKG2C (Orbelyan et al, 2014). Por el contrario, hay indicios de que NKG2H (la isoforma de NKG2E) se expresa en la membrana celular de un pequeño porcentaje de linfocitos, principalmente T CD8+ y de que es también funcional (Dukovska, tesis doctoral UAM 2015).

Los heterodímeros CD94/NKG2 reconocen moléculas HLA-E cargadas con péptidos derivados de la mayoría de las variantes alélicas de HLA-A y -C, HLA-G y varios alotipos HLA-B, a través de un mecanismo TAP-dependiente (Braud et al, 1998a y b; Kaiser et al, 2005; Lee et al, 1998a y b). El hecho de que los ligandos de los complejos CD94/NKG2 sean moléculas MHC y la mayor afinidad para su ligando del receptor inhibitor en comparación con los activadores, implica que estas proteínas tienen un papel clave en el control de la expresión de moléculas propias y, por tanto, en la vigilancia de los cambios inducidos por patógenos o procesos tumorales en la expresión de estas moléculas HLA. Además, se ha demostrado que las moléculas HLA-E pueden unirse también, con afinidad variable, a péptidos derivados de algunos patógenos; en particular, un péptido de la secuencia señal de la proteína UL40 de algunas cepas de hCMV se une a HLA-E y estabiliza su expresión en la membrana celular (Nattermann et al, 2005; Tomasec et al, 2000; Ulbrecht et al, 2000). Este mecanismo podría permitir la evasión del virus del control de la infección a través de CD94/NKG2A y, a la vez, ofrecer una posible explicación para la presencia de receptores activadores homólogos.

Efectivamente, hay evidencias que sugieren una contribución importante del receptor activador NKG2C en el control de la infección por el hCMV (López-Botet et al, 2014). En concreto, en muchos de los individuos seropositivos para hCMV se ha observado un aumento estable de la expresión de NKG2C en un porcentaje variable de sus células NK, proceso que parece directamente relacionado con la infección activa (Gumá et al, 2004). Esta subpoblación $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-$ se mantiene a lo largo de la vida del individuo y se la considera un subtipo de células NK en un estado de diferenciación más tardío que la mayoría de las células NK CD56^{dim} , con características de memoria, posiblemente generada por una expansión clonal inducida por el hCMV (Muntasell et al, EJI 2013). Expansiones de subpoblaciones $\text{NKG2C}^{\text{bright}}$ se han observado también en otras infecciones virales, pero en todas ellas hay una asociación con el hCMV (Beziat et al, 2011; Björkström et al, 2011a; Gumá et al, 2006; Petitdemange et al, 2011). De manera reminiscente a hCMV, la infección primaria por EBV cambia el repertorio de células NK del individuo, aumentando el porcentaje de células que expresan NKG2A. A esta subpoblación de células $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{NKG2A}^+\text{NKG2C}^-$, que también persiste a lo largo del tiempo y tiene características de diferenciación terminal (Azzi et al, 2014; Hendricks et al, 2014), se la ha implicado en el control de la transformación maligna de las células EBV+ (Lünemann et al, 2013).

El complejo NKC

La familia de receptores NKG2 está codificada en el locus *NKC* (*NK complex*) en el cromosoma 12p12-13 humano (**Figura 6**). En contraposición con la gran variabilidad genética del complejo KIR, el locus *NKC* está muy conservado (Shum et al, 2002). Sin embargo, se han descrito tanto un limitado polimorfismo alélico, como la variación del número de copias del gen que codifica NKG2C (*KLRC2*) debida a su delección completa. En dos poblaciones, japonesa y holandesa, se ha visto que más de un 30% de los individuos llevan una sola copia de *KLRC2* y aproximadamente un 4% de la población carece del gen por presentar la delección en homocigosis (Hikami et al, 2003; Miyashita et al, 2004).

Aunque los individuos $\text{KLRC2}^{\text{Del/Del}}$, que no expresan NKG2C, no son más propensos a desarrollar infección congénita sintomática por hCMV, los portadores de dos copias *KLRC2* tienen mayor expresión del receptor en la membrana y su activación es más intensa que la de los sujetos $\text{KLRC2}^{\text{Wt/Del}}$ (Muntasell et al, 2013; Noyola et al, 2012). Si bien la variación del número de copias del gen *KLRC2* podría influir sobre el control de la infección por HSV-1, todavía no existen estudios al respecto.

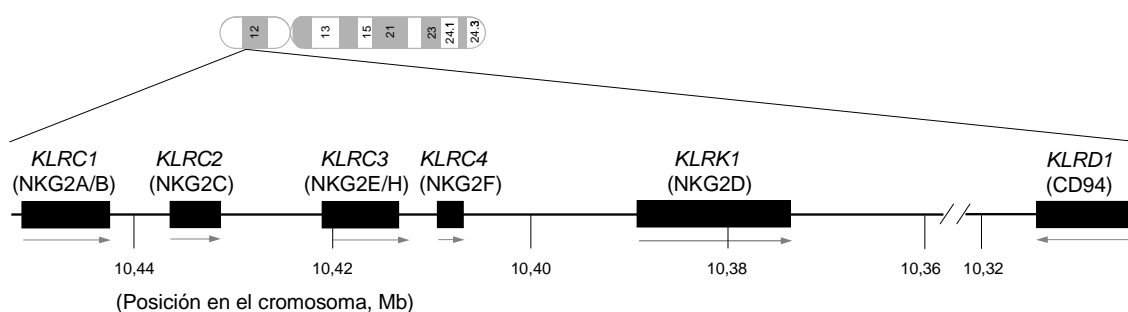


Figura 6. El NKC en el cromosoma 4.

2.2.3. Los receptores para el fragmento cristalizable de la IgG

Estructura de los FcγR

Los efectos biológicos de los anticuerpos dependen en parte de la interacción de su fragmento cristalizable (Fc) con sistemas efectores como el complemento o receptores celulares. Los receptores para el Fc de las IgG (FcγR) forman un nexo entre las respuestas inmunitarias humorales y celulares, confiriendo especificidad para antígenos a las células que los expresan (ver apartado 4.3 y **Tabla 2**). La unión de inmunocomplejos Ag-Ac a los FcγR desencadena respuestas inmunitarias muy variadas, participando tanto en mecanismos efectores como la fagocitosis y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), como en la modulación de la presentación antigénica y la maduración de las células dendríticas, o la regulación de la activación de los linfocitos B y la supervivencia de las células plasmáticas (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

Los FcγR humanos son proteínas de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas con dos o tres dominios extracelulares que, en función de su estructura y afinidad para la IgG, se subdividen en tres grandes clases: FcγRI (CD64, con alta afinidad para la IgG), FcγRII (que incluye tres proteínas similares: CD32A, CD32B y CD32C, que se unen a sus ligandos con baja afinidad) y FcγRIII (CD16A y CD16B, también de baja afinidad para la IgG) (**Figura 7**).

A diferencia de CD64 y CD16A, que se unen a moléculas adaptadoras (como la cadena ζ de CD3 o las cadenas γ o β de FcεRI) para transmitir señales intracelulares, el fragmento citoplasmático de los receptores CD32 incluye motivos ITIM o ITAM. CD16B carece de región intracitoplásmica y se ancla a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol (Gillis et al, 2014). La mayoría de los FcγR transmiten señales activadoras, siendo CD32B el único receptor inhibidor.

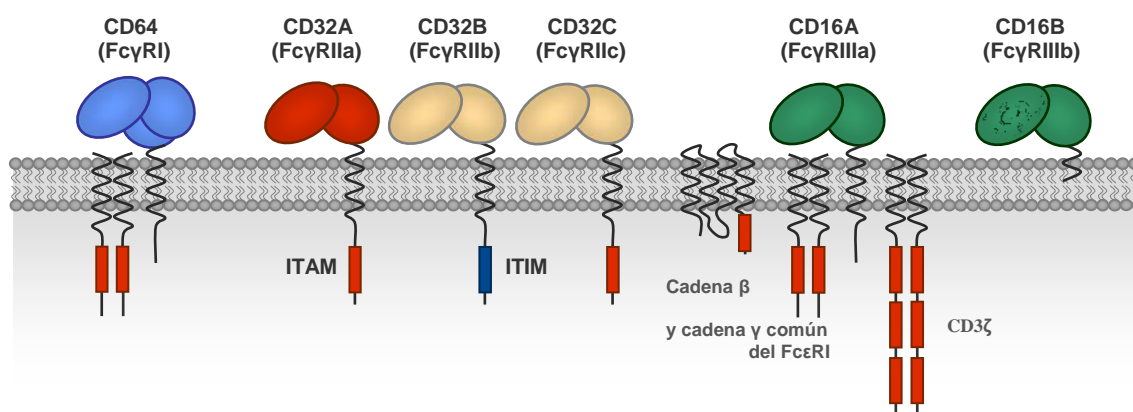


Figura 7. Estructura de los FcγR.

El locus FCGR

Los genes que codifican los FcγR están localizados en el cromosoma 1. Se han descrito tres genes para FcγRI, *FCGR1A*, *FCGR1B* y *FCGR1C*, de los que solamente *FCGR1A* (CD64) codifica una proteína de membrana (van Sorge et al, 2003). Los genes para los FcγR de baja afinidad (CD32 y CD16) están agrupados en el locus *FCGR* en el brazo corto del cromosoma 1 (1q23), una región en la que se ha descrito tanto polimorfismo de secuencia como variación de número de copias. Los cinco genes (*FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* y *FCGR3B*) surgieron a través de duplicaciones segmentarias; así, a partir de *FCGR2* y *FCGR3*, en un paso inicial se habría duplicado *FCGR2*, generando un locus con tres genes (*FCGR2A*, *FCGR3* y *FCGR2B*). Esta región habría vuelto a duplicarse y recombinar, dando lugar a la secuencia de referencia actual del locus (Hollox et al, 2014; Warmerdam et al, 1993; **Figura 8**).

La altísima homología de los fragmentos 5' y 3' del locus (>98%, representados en la Figura 8 en verde y azul, respectivamente) y la secuencia de *FCGR2C*, que parece ser el resultado de la recombinación entre *FCGR2A* y *FCGR2B*, apoyan esta hipótesis. Además, se han descrito otras deleciones y duplicaciones que incluyen los genes de la región central del locus, que codifican CD16A, CD16B y CD32C (Breunis et al, 2009; **Figura 8**). Entre ellas, una deleción de ~70-kpb determina la expresión ectópica del receptor inhibitor CD32B en las células NK (van der Heijden et al, 2012; Mueller et al, 2013).

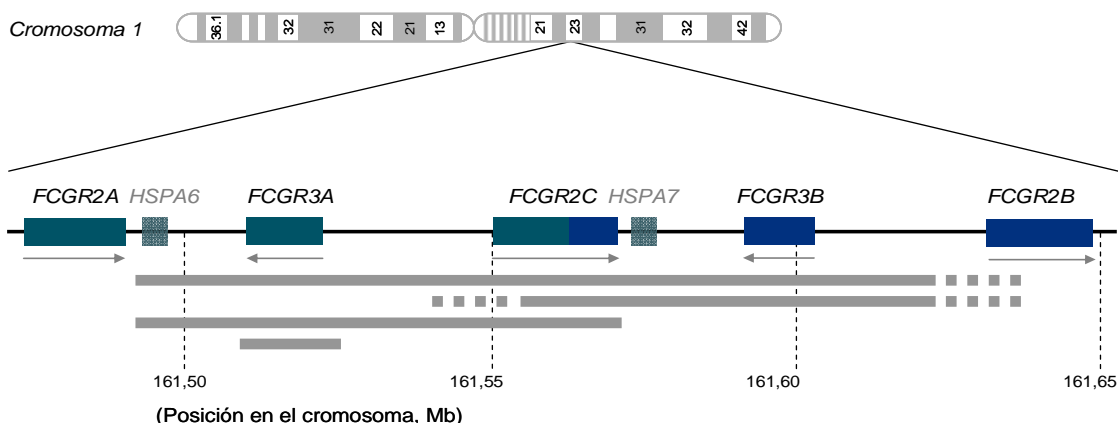


Figura 8. El complejo *FCGR*. Cada rectángulo corresponde a un gen del locus, cuyo nombre aparece en la parte superior. Las flechas debajo de cada gen indican su orientación. En verde y azul se han representado los dos fragmentos del locus *FCGR* que habrían surgido por duplicación segmentaria. Las líneas grises indican que estas zonas del locus pueden estar duplicadas o delecionadas. Se ha representado punteado un fragmento de 24,5 kb donde estaría la zona de recombinación que condiciona la expresión de CD32B en las células NK (Breunis et al, 2009; Hollox et al, 2014; Mueller et al, 2013).

Polimorfismos puntuales (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en los genes del locus *FCGR* tienen también implicaciones funcionales (**Tabla 1**). En este sentido, un SNP en el intron 5 de *FCGR2A* conlleva la inclusión del exón críptico 6 en el marco de lectura de una minoría de los individuos (generando un aumento de la activación celular tras el reconocimiento de la IgG a través de CD32A (van der Heijden et al, JACI 2013).

Tabla 1. Variaciones genéticas en el locus *FCGR*.

Gen (receptor)	Variante	Efecto	SNP de referencia
FCGR2A (CD32A)	R131H	Aumento de la afinidad para IgG2	rs1801274
	c742+871A>G	Aumento de la activación celular tras la unión de IgG	rs72717038
FCGR2B (CD32B)	-386G>C ¹	Aumento de la expresión	rs3219018
	-120T>A ¹		rs34701572
	I232T	Disminución de la expresión	rs1050501
FCGR2C (CD32C)	Q13X	Expresión de proteína	rs10917661
	c798+1A>G	Expresión de proteína	rs76277413
	CNV	Correlación con los niveles de expresión	
		Expresión ectópica de CD32B en células NK	
FCGR3A (CD16A)	F158V	Aumento de la afinidad para IgG1, IgG2 e IgG3	rs396991
	L48H	Alteración funcional de las células NK	rs10127939
	CNV	Correlación con los niveles de expresión	
FCGR3B (CD16B)	HNA-1a/b/c	Aumento de la fagocitosis (HNA-1a)	n.a.
		Aumento de la expresión (HNA-1c)	
	CNV	Correlación con los niveles de expresión	
		Expresión ectópica de CD32B en células NK	

1 -386C-120A definen el haplotipo de mayor expresión. n.a., no aplicable.

La inhibición a través de CD32B está también modificada por variaciones genéticas que afectan su expresión; así, un haplotipo determinado por varios SNPs en la región promotora del *FCGR2B* aumenta su transcripción, mientras que el cambio de una isoleucina por treonina en el fragmento transmembrana (I232T), reduce su expresión en la membrana celular (Floto et al, 2005; Su et al, 2004a y 2004b).

Un SNP en el exón 3 de *FCGR2C* introduce un codón de parada prematuro (Q13X). Su alta frecuencia en la población – aproximadamente un 80% de los individuos sanos son homocigotos para este polimorfismo y, por tanto, carecen por completo de CD32C – ha hecho que se le considerase un pseudogén (Breunis et al, 2008; Metes et al, 1998; Su et al, 2002). Pero la expresión de CD32C no está condicionada solamente por este polimorfismo. Otro 4% de los individuos sin el cambio Q13X en al menos una de sus copias *FCGR2C*, carecen también del receptor en la membrana. Esto es debido a otro SNP en el sitio donador de *splicing* del intrón 7 que cambia el marco de lectura introduciendo otro codón de parada prematuro (van der Heijden et al, 2012).

Otros SNPs modifican la afinidad de los FcγR por su ligando; así, un cambio R131H de la molécula CD32A aumenta su afinidad para IgG2 (Salmon et al, 1992). De manera similar, el cambio F158V de CD16A aumenta su afinidad por IgG1 e IgG3 (Radaev et al, 2001; Sondermann et al, 2000; Wu et al, 1997) y el cambio L48H en CD16A (o L66H, según se tome o no en cuenta la secuencia del péptido señal) ha sido implicado en la alteración de la función de las células NK, pero su relevancia sigue siendo controvertida (Forbes et al, 2009; Grier et al, 2012; Jawahar et al, 1993; de Vries et al, 1996).

Por último, varios SNPs en *FCGR3B* determinan los antígenos neutrofílicos HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c, que modifican la eficacia de la fagocitosis (Koene et al, 1998; Salmon et al, 1992).

Todas estas variaciones genéticas del locus FCGR podrían tener implicaciones en el desarrollo o en la severidad de diferentes enfermedades inmuno-mediadas. Efectivamente, gran parte de los polimorfismos descritos han sido asociados con el curso clínico de varias enfermedades autoinmunes e infecciosas y, además, con la respuesta a terapias basadas en anticuerpos (Gillis et al, 2014; van Sorge et al, 2003). Pero pese a su potencial relevancia, su papel en las infecciones virales ha sido escasamente estudiado.

Patrón de expresión y afinidad para la IgG

Prácticamente todas las subpoblaciones de leucocitos, y también las plaquetas, expresan al menos un subtipo de FcγR. Mientras que estirpes celulares implicadas en

la inmunidad innata, como monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos expresan varios tipos de FcγR, tanto activadores como inhibidores, los linfocitos B de la mayoría de los individuos sanos solamente expresan CD32B (Nimmerhajn y Ravetch, 2008; Takai 2002). Aunque clásicamente se haya cuestionado la expresión de FcγR en los linfocitos T, estudios recientes sugieren que algunas subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ activadas expresan también CD32B (Starbeck-Miller et al, 2014). El único FcγR expresado por la mayoría de las células NK (CD56^{dim}) es CD16A. Sin embargo, variaciones genéticas determinan la expresión de CD32B y CD32C en este subtipo celular en una minoría de individuos (Duertre et al, 2008; Ernst et al, 2002; van der Heijden et al, 2012; Metes et al, 1998; Mueller et al, 2013; **Tabla 2**).

Tabla 2. Patrón de expresión de los FcγR. (adaptada de Hogarth y Pietersz, 2012 y Gillis et al, 2014 y actualizada)

	<i>FcγRI</i> (CD64)	<i>FcγRIIA</i> (CD32A)	<i>FcγRIIB</i> (CD32B)	<i>FcγRIIC</i> (CD32C)	<i>FcγRIIIA</i> (CD16A)	<i>FcγRIIIB</i> (CD61B)
<i>Linfocitos T</i>	No	Dudosa	Sí ¹	No	Dudosa	No
<i>Linfocitos B</i>	No	No	Sí	Dudosa ^{2,3}	No	No
<i>Células NK</i>	No	No	Sí ³	Sí ³	Sí	No
<i>Macrófagos</i>	Sí ⁴	Sí	Sí	Sí ³	Sí	No
<i>Monocitos</i>	Sí	Sí	Sí	Sí ³	Sí	No
<i>Neutrófilos</i>	Sí ⁴	Sí	Sí	Sí ³	No	Sí
<i>Eosinófilos</i>	Sí ⁴	Sí	Dudosa	No	No	Dudosa
<i>Basófilos</i>	No	Sí	Sí	No	No	Sí
<i>Mastocitos</i>	Sí ⁴	Sí ⁵	Dudosa	No	Dudosa	Dudosa
<i>Plaquetas</i>	No	Sí	No	No	No	No

1 Una subpoblación de linfocitos T de memoria; Starbeck-Miller et al, 2014

2 Un estudio reciente (Li et al, 2013) demuestra expresión de CD32C en los linfocitos B de individuos sin codon de parada prematuro en la secuencia de *FCGR2C*

3 Solo en una minoría de individuos; condicionada genéticamente (ver apartado 4.2. del texto)

4 Inducida por citoquinas

5 Mastocitos no estimulados derivados de células de cordón umbilical; Kopley et al, 2004

La especificidad y la afinidad de los FcγR para la IgG están bien documentadas (Bruhns et al, 2009). CD64, el único FcγR de alta afinidad, se une a IgG1, IgG3 e IgG4 con una constante de afinidad (k_a) en el rango de los nanomoles, de 10 a 100 veces mayor que CD32 y CD16 (**Figura 9**). CD64 puede unirse tanto a IgG monomérica como a inmunocomplejos, a diferencia de los FcγR de baja afinidad, que solo se unen con una avidez considerable a complejos IgG-Ag. En consecuencia, una alta concentración de anticuerpos circulantes no satura los FcγR de baja afinidad. Dentro de cada grupo de FcγR, la afinidad para las diferentes subclases de IgG puede variar hasta 10 veces; así, la afinidad de CD32A para IgG1 es 10 veces mayor que para

IgG4 (Powell et al, 1999). Además, y como se detalla en el apartado anterior, polimorfismos genéticos pueden cambiar la afinidad de la unión FcγR – IgG (Bruhns et al, 2009).

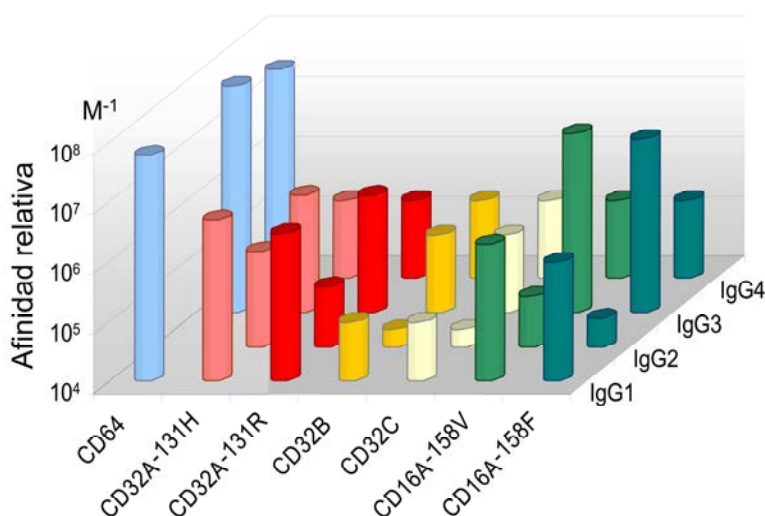


Figura 9. Afinidad de los FcγR para las diferentes subclases de IgG (los valores utilizados son los publicados por Gillis et al, 2014 y Bruhns et al, 2008).

2.2.4. Alotipos de las inmunoglobulinas

En tanto que los FcγR y la afinidad de algunas de sus variantes alélicas por las distintas subclases de inmunoglobulinas han sido ampliamente estudiados (apartado 4.2), no ocurre lo mismo con el efecto del polimorfismo genético de las propias inmunoglobulinas. Se han descrito 26 alotipos en las cadenas pesadas γ1, γ2, γ3 y α2, y en la cadena ligera κ. Según la nomenclatura aprobada por la Organización Mundial de la Salud son designados como Gm, Am o Km (de gamma, alfa o kappa *marker*), respectivamente, con un número para las subclases (e.g. G1m para la IgG1) y seguido por un número de orden (p.ej. G1m1, Km3) (WHO, 1976). En la cadena γ1 se han identificado seis alotipos (G1m1, G1m2, G1m3, G1m17, G1m27 y G1m28), de los que los dos últimos solo se han encontrado en poblaciones negroides. Mientras que en la cadena γ2 se ha descrito un único alotipo, G2m23, hay hasta trece alotipos identificados hasta ahora en la cadena γ3. De los tres alotipos de la cadena ligera κ (Km1, Km2 y Km3), Km2 se encuentra casi invariablemente junto a K1m (Lefranc y Lefranc 2012).

Debido a fuertes desequilibrios de ligamiento en el locus *IGH*, los alotipos IgG (e IgA) se heredan también en bloques. Los haplotipos Gm más comunes en caucasoides (A y B) llevan el alotipo G1m3, y están presentes en aproximadamente un 75% de estos individuos. Otros haplotipos que se encuentran con frecuencias >0.01 en caucasoides

incluyen G1m17,1 (~15%) o G1m17,1,2 (~6%) (Mayr y Mickerts, 1970; Schanfield et al, 1975a y b). Por tanto, en poblaciones caucasoides el alotipo G1m17 se asocia invariablemente a G1m1, encontrándose la combinación G1m3,1 solamente en un 15% de ciertas poblaciones mongoloides (van Loghem y Natvig, 1970).

En la infección por HSV-1, los únicos datos disponibles sobre la posible contribución de los alotipos de las inmunoglobulinas al curso clínico de la enfermedad se limitan al estudio de su unión al receptor para la IgG1 generado por las glicoproteínas virales gE y gI (ver más adelante). En particular, este señuelo viral se une a inmunoglobulinas de alotipo G1m3 con menor afinidad que las G1m17,1, cambio de afinidad directamente relacionado con el residuo 214 de la cadena $\gamma 1$ (Atherton et al, 2000). De acuerdo con estos datos, se ha propuesto una hipótesis según la cual la susceptibilidad al HSV-1 pudiera estar determinada en parte por este polimorfismo (Pandey et al, 2012), lo que trataremos de verificar en este trabajo.

Los alotipos G1m17 y G1m3 se distinguen por una sustitución Lys214Arg en el dominio CH1 y son mutuamente excluyentes. G1m1 está situado en el dominio CH3, fuera de la zona inferior bisagra del Fc, y se caracteriza por un aspártico en la posición 356 y un residuo de leucina en la posición 358. (**Tabla 3**).

Tabla 3. Los alotipos de la IgG1.

Alotipo	Dominio CH1	Dominio CH3		
	214*	356*	358*	431*
consenso	Arg	Glu	Met	Ala
G1m1		Asp	Leu	
G1m2				Gly
G1m3	Arg			
G1m17	Lys			

* numeración de aminoácidos según la UE

Ninguno de estos aminoácidos ha sido directamente implicado en la interacción Fc γ R-IgG (Shields et al, 2001; Sondermann et al, 2000), pero estos polimorfismos, al igual que los que determinan los alotipos Km, podrían contribuir a interacciones alostéricas que modifiquen la afinidad de esta unión. Esta hipótesis está apoyada por ensayos de afinidad que han mostrado que CD16A SE une con mayor avidez A inmunoglobulinas con alotipo G1m3 que G1m17,1 (Armour et al, 2010). Asimismo, ensayos de competición, en los que se intenta bloquear la ADCC frente a dianas conocidas con exceso de agregados de inmunoglobulinas de alotipo conocido, confirman que G1m3 compite eficazmente con anticuerpos monoclonales con alotipo G1m17 (Namboodiri y Pandey, 2011).

2.3. La respuesta inmunitaria celular y humoral

Las células citotóxicas, principalmente los linfocitos T CD8+ (CTL) y las células NK, son los efectores celulares más importantes en las infecciones virales. En la infección activa por HSV-1, los primeros linfocitos que infiltran la lesión son las células NK, seguidas por los linfocitos T CD4+ y, por último, los CD8+, relacionándose estrechamente su reclutamiento al sitio de la infección con el aclaramiento del virus (Koelle et al, 2003). Apoyando que el papel de los anticuerpos específicos en la respuesta inmunitaria al HSV-1 es igualmente relevante está la relación inversa entre la gravedad de la infección neonatal y la presencia de anticuerpos anti-HSV en la madre (Brown, 1991).

2.3.1. Las células NK

Las células NK son linfocitos que no expresan receptores clonotípicos para antígeno y que pueden diferenciarse a partir de un progenitor común con los linfocitos T. Constituyen aproximadamente un 10% de los linfocitos circulantes y se encuentran, en proporciones variables, entre las células de origen linfoide del intestino, hígado, pulmón, decidua uterina y órganos linfoides secundarios (Trincheri, 1989; Yu et al, 2013). Como se ha mencionado en un apartado anterior, las células NK expresan una serie de receptores activadores e inhibidores, siendo dictada su función por el resultado de una compleja relación entre las señales positivas y negativas desencadenadas tras la unión de estos receptores a sus correspondientes ligandos. Aunque todavía quedan varios receptores de células NK “huérfanos”, muchos de sus ligandos han sido identificados y caracterizados en las últimas décadas, estando su gran mayoría relacionados, de diferentes maneras, con la vigilancia de la presencia de células infectadas o transformadas. Así, varias estructuras derivadas de patógenos son reconocidas por TLRs y receptores citotóxicos naturales (NCR); algunas moléculas inducidas por la infección o el estrés celular son ligandos para NKG2D, NCRs, DNAM-1 (CD226) y 2B4 (CD244); las células opsonizadas pueden ser reconocidas a través de FcγR; y varias subfamilias de receptores, tanto activadores como inhibidores, controlan el nivel de expresión de las moléculas HLA de clase I (ver detalles en el capítulo 3 de esta introducción) (Lanier, 2005; Li et al, 2014). La activación de las células NK desencadena respuestas potentes e inmediatas tras el reconocimiento de una célula diana, a través de mecanismos de citolisis (vía liberación de perforina y granzimas), activación de la apoptosis y producción de citoquinas (como IFN-γ y TNF-α) y quimioquinas, controlando así otros mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos implicados en la respuesta antiviral (Marras et al, 2014; Trincheri, 1989).

Las células NK forman una población heterogénea en cuanto a sus características fenotípicas, proliferativas y funcionales. La mayoría de células NK circulantes tiene una expresión relativamente baja de CD56 (CD56^{dim}), alta expresión de CD16 y funcionalmente son citotóxicas y secretoras de citoquinas. En cambio, aproximadamente un 5-10% de ellas tienen una mayor densidad de CD56 en su superficie (CD56^{bright}), no expresan CD16, pueden producir grandes cantidades de citoquinas tras su estimulación y tienen una gran capacidad proliferativa, pero poca citotóxica. A este subtipo de células NK, con un fenotipo mayoritariamente CD56^{bright}CD16⁻NKG2A⁺KIR⁻, algunos autores las consideran precursores de las células NK CD56^{dim}CD16⁺NKG2A⁻KIR⁺ en sangre, siendo la pérdida progresiva de NKG2A y la adquisición de KIR un proceso activo de diferenciación (Beziat et al, 2010).

La generación de células NK con fenotipo “de memoria” inducido por patógenos como el hCMV (detallado en el apartado 3.2.1.) apoya la existencia de características típicas de la inmunidad adaptativa y diferenciación terminal para las células NK. En este sentido, la expresión estable de NKG2C y CD57 y la pérdida de la cadena FcεR1γ se perfilan como marcadores de diferenciación tardía de las células NK (Bjorkström et al, 2010; Muntasell et al, 2013; Zhang et al, 2013a).

La relevancia de las células NK en la infección por HSV-1 se ha confirmado en pacientes con algunas inmunodeficiencias primarias graves, en los que la falta o la disfunción de las células NK determinada por mutaciones en diferentes genes implicados en su desarrollo, se acompaña, casi invariablemente, por infecciones virales, sobre todo por herpesvirus (Jouanguy et al, 2013; Orange et al, 2013). Además, varios estudios confirman la presencia de células NK en los infiltrados inflamatorios de los sitios de infección activa y su papel en el aclaramiento del virus (Carr et al, 2008; Cunningham et al, 1985; Frank et al, 2012; Sirianni et al, 1986; Vogel et al, 2014). Asimismo, estudios en ratones deplecionados de células NK o a los que se les transfieren células NK funcionales o no, apoyan su papel clave en el control de la infección (Kohl et al, 1986; Rager-Zisman et al, 1987). De manera similar, en un modelo murino de infección por HSV-1 se ha demostrado la necesidad de una respuesta NK eficaz para el control de la infección productiva, identificándose además un locus de resistencia a la infección por HSV-1 cerca de la región *NKC* (Pereira et al, 2001).

Notablemente y a diferencia de otros herpesvirus, todavía no se han identificado estructuras derivadas del HSV-1 que funcionen como ligandos virales para receptores activadores expresados en las células NK. Sin embargo, el reconocimiento de patrones moleculares alterados por la infección ha sido directamente implicado en el control del HSV-1. Así, se ha demostrado que la expresión de la proteína viral ICP0 es

necesaria y suficiente para aumentar la susceptibilidad de las células infectadas a la lisis mediada por células NK, de manera dependiente de la activación de los NCR (Chisholm et al, 2007). Además, DNAM1 (CD226) reconoce una proteína (nectina-2 o CD112, también conocida como HveB o PRR2) que facilita la entrada de algunas cepas de HSV-1 en las células diana, sugiriendo que, de manera similar a lo observado en procesos tumorales, la presencia del virus aumentaría la expresión de nectina-2, que funcionaría como estímulo para la activación de las células NK a través de DNAM-1 (Bottino et al, 2003; Warner et al, 1998). Por último, se han descrito potentes respuestas dependientes de anticuerpos mediadas por una subpoblación de células NK frente a células infectadas por HSV-1. Dicha subpoblación tiene características de memoria, un fenotipo $CD56^{dim}Fc\epsilon RI\gamma^{-}NCR^{low}NKG2A^{low}CD57^{hi}$ y, predominantemente, $NKG2C^{bright}$ y una alta capacidad de producir IFN- γ en presencia de anticuerpos anti-HSV-1 y fibroblastos infectados (Hwang et al, 2012; Zhang et al, 2013a).

2.3.2. Los linfocitos T

En la infección primaria por HSV, las APCs (principalmente células dendríticas, DC), activadas directamente por patógenos o a través de IFN-I, se cargan con antígenos virales que transportan a los órganos linfáticos secundarios (Allan et al, 2006; Pollara et al, 2004). Los linfocitos T *naïve* específicos para el antígeno se activan y proliferan en los ganglios linfáticos tras el reconocimiento de péptidos virales presentados por las DCs. De esta manera, se generan linfocitos T efectores que migran a los sitios de la infección activa. Una vez controlado el proceso patológico, hay una fase de contracción, manteniéndose una pequeña población de linfocitos T de memoria. La generación de linfocitos T efectores requiere varios días pero aunque las respuestas adaptativas sean relativamente lentas, su intensidad y especificidad sobrepasan ampliamente a las de la inmunidad innata.

Los linfocitos T CD8+ efectores específicos para antígenos virales, a través de mecanismos citolíticos y producción de citoquinas, contribuyen al aclaramiento del virus en el sitio de la infección. Además, estos linfocitos se acumulan alrededor de las neuronas HSV-1+ en los ganglios sensitivos de ratones y humanos y se han implicado en el control del mantenimiento del estado latente del virus (Feldman et al, 2002; Khana et al, 2004; Knickelbein et al, 2008; Liu et al, 2000; Theil et al, 2003; Verjans et al, 2007). Puesto que las neuronas infectadas no son destruidas por los linfocitos T CD8+ y considerando que solo una fracción de los linfocitos T CD8+ presentes en los ganglios sensitivos expresan granzima B (Held y Derfuss, 2011), se han propuesto mecanismos no citolíticos implicados en este control. En este sentido, se ha demostrado en modelos murinos que el IFN- γ producido por estos linfocitos impide la reactivación del

virus en los ganglios sensitivos (Decman et al, 2005; Liu et al, 2001). Además, se ha planteado la existencia de un efecto no citolítico de los productos de sus gránulos sobre el control de la replicación viral. Evidencias que apoyan esta teoría incluyen (i) la dificultad de mantener el estado latente del HSV en ratones deficientes de granzima A, B y de perforina, (ii) el hecho de que la liberación de enzimas líticas por los linfocitos T CD8+ en los ganglios sensitivos no induce la apoptosis de las neuronas infectadas, (iii) la capacidad de los LAT de bloquear el efecto de la granzima B sobre las caspasas, ofreciendo así una explicación para la supervivencia de las neuronas HSV-1+ y (iv) la capacidad de la granzima B de degradar la proteína *IE* ICP4. Todo ello sugiere, por tanto, que las granzimas liberadas por los linfocitos T CD8+ ejercen un efecto directo (o indirecto, a través de la activación de otros enzimas) sobre proteínas virales en fases tempranas del ciclo viral (Jiang et al, 2011; Knickelbein et al, 2008; Pereira et al, 2000).

Los linfocitos T CD4+ efectores están también presentes en las lesiones activas junto con las células NK y los linfocitos T CD8+, siendo una importante fuente de IFN- γ . Además, de manera similar a los linfocitos T CD8+, aunque en proporciones menores, se ha demostrado que se acumulan en los ganglios sensitivos que albergan HSV-1 en estado latente (Khana et al, 2004; Theil et al, 2003; van Velzen et al, 2013; Verjans et al, 2007). No obstante su papel clave en la respuesta adaptativa antiviral, colaborando en la activación de los linfocitos B y T CD8+, se desconoce todavía su contribución al mantenimiento del virus en estado latente (Frank et al, 2010; Shedlock et al, 2003; Sun et al, 2003; van Velzen et al, 2013).

Mientras que la respuesta de los linfocitos T CD4+ puede ser desencadenada por una amplia gama de antígenos virales, incluyendo proteínas de la envuelta, tegumento, cápside y no estructurales, la respuesta mediada por los linfocitos T CD8+ parece ser bastante restringida, sobre todo en los ganglios sensitivos. La mayoría de los epítomos reconocidos por estos linfocitos, tanto en humanos como en ratones, proceden de proteínas virales producidas antes del inicio de la replicación del ADN viral (Derfuss et al, 2007; Koelle et al, 2003; St. Leger et al, 2011a; van Velzen et al, 2013). Aunque el mecanismo responsable de esta selección de los epítomos T CD8+ no se conoce, parece claro que debería ofrecer importantes ventajas para el control de las reactivaciones. Alternativamente, esta restricción del repertorio de linfocitos T CD8+ podría derivar de la capacidad de ciertas moléculas HLA de clase I para presentar péptidos procedentes de estas proteínas. Puesto que todavía no se han identificado alelos HLA claramente relacionados con la resistencia o la susceptibilidad a la infección por HSV-1, este campo sigue abierto a más estudios. En particular, la capacidad de las moléculas HLA de clase I para presentar péptidos derivados de

proteínas virales codificadas por genes *IE* requiere especial atención, sobre todo en relación con la capacidad de los linfocitos T CD8+ para controlar el estado latente del HSV-1.

2.3.3. La inmunidad humoral

En la primoinfección por HSV-1, los linfocitos B naïve específicos para estructuras derivadas del HSV-1 que encuentran estos antígenos en los órganos linfáticos secundarios se activan, proliferan y continúan diferenciándose. Algunos de ellos maduran hacia células plasmáticas, otros migran a los centros germinales donde sufren procesos adicionales de cambio de isotipo y maduración de la afinidad. Las células que sobreviven a estos procesos selectivos proliferan y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-HSV-1 de alta afinidad, o linfocitos B de memoria. Puesto que todos estos mecanismos requieren más de una semana, durante la primoinfección la respuesta de anticuerpos es tardía; sin embargo, su eficacia mejora progresivamente, siendo retenidas las características adquiridas durante este proceso por las células B de memoria para respuestas secundarias. Los anticuerpos anti-HSV-1 de isotipo IgG ejercen efectos neutralizantes y de opsonización, participando en la activación de la vía clásica del complemento y en la ADCC (Mathiesen et al, 1998). Aunque su presencia no parece conferir protección en todos los sujetos seropositivos, los distintos mecanismos de evasión desarrollados por el virus para contrarrestar sus efectos (revisados en el apartado 3) apoyan su papel clave durante la infección.

La gran mayoría de los individuos seropositivos tiene anticuerpos anti-HSV-1 de tipo IgG1, mientras que solamente en la mitad de ellos se han detectado anticuerpos específicos de tipo IgG3, siendo ocasional la presencia de anticuerpos anti-HSV-1-IgG4 e -IgG2 (Mathiesen et al, 1988). Los anticuerpos específicos de tipo IgG1 e IgG3 tienen efectos neutralizantes, reclutan complemento y pueden mediar ADCC y son reconocidos, con diferente afinidad, por los FcγR (Bruhns et al, 2009; Mathiesen et al, 1988). Pero, mientras que los pacientes deficientes de diferentes factores del complemento no tienen mayor susceptibilidad a la infección que los individuos sanos, se ha atribuido una mayor relevancia a la ADCC mediada por las células NK (Orange 2013; Walport 2001; Zhang et al, 2013b).

3. MECANISMOS DE INMUNOEVASIÓN DEL HSV-1

Para asegurar su supervivencia en la célula infectada, el HSV-1 ha desarrollado una serie de mecanismos para controlar a la célula hospedadora y evadir la respuesta

inmunitaria. Así, varias proteínas virales bloquean selectivamente la síntesis de nuevas proteínas celulares, inhiben, degradan selectivamente o subvierten la función de proteínas celulares ya sintetizadas, o restringen la señalización que alerta de que una célula está infectada. Los mecanismos que afectan a las interacciones entre el virus y el sistema inmunitario son especialmente relevantes para entender la variabilidad clínica de la infección. Si bien el control de la respuesta innata es muy importante en la primoinfección, puesto que la replicación viral se inicia antes de la maduración de la respuesta inmunitaria adquirida, las estrategias de inmunoevasión deberían ser más amplias para facilitar todos los estadios de la infección, afectando tanto a mecanismos inmunitarios innatos como adaptativos.

Efectivamente, se ha descrito ya una larga serie de mecanismos de inmunoevasión desarrollados por el HSV-1. De especial relevancia es la alteración de las vías de activación mediadas por los interferones. La inducción de la producción de IFN-I requiere la activación de factores de transcripción como IRF3 (*interferon regulatory factor*) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B). A su vez, la activación de sus receptores desencadena una cascada de fosforilación de las quinasas de Jano (Jak) y las moléculas Stat, que llevan a la transcripción de genes regulados por interferones y a respuestas antivirales (Mossman y Ashkar, 2005). Tanto la producción de IFN-I como la señalización a través de sus receptores son dianas para el HSV-1. Así, la proteína viral ICP0 bloquea tanto la activación del NF- κ B inducida por la activación de TLRs (mediante deubiquitinilación específica de algunos de sus moduladores: TRAF6 y NEMO), como la señalización a través de IRF, limitando la producción de interferón (Daubeuf et al, 2009; Lin et al, 2004; van Lint et al, 2010; Melroe et al, 2004; Mossman y Smiley, 2002; Orzalli et al, 2012). De manera similar, las proteínas del tegumento U_S3 y VP16, codificadas por *US3* y *UL48*, respectivamente, restringen la producción de IFN-I deubiquitinilando TRAF6 y bloqueando el reclutamiento de un co-activador del IRF3 (CBP, *CREB binding protein*), respectivamente (Sen et al, 2013; Xing et al, 2013). Además, la RNAasa U_L41 y la proteína viral ICP27, codificada por el gen *IE UL54*, reducen la disponibilidad de Jak1, Stat1 y Stat2, restringiendo así la señalización a través de receptores para interferón (Chee y Roizman, 2004; Johnson y Knipe, 2009; Suzutani et al, 2000). Adicionalmente, las proteínas virales U_S11 y R_L1 interfieren con la respuesta celular frente a ARN de doble cadena (dsRNA, un marcador de la infección viral) impidiendo de esta manera tanto la activación del NF- κ B como la muerte programada de la célula infectada (Ishioaka et al, 2013; Leib et al, 2000; Mossman y Smiley, 2002; Taddeo et al, 2003; Xing et al, 2012).

Adicionalmente, las proteínas virales ICP0, U_L36, U_L42 y VP16 bloquean la activación del NF- κ B inducida por TNF- α , deubiquitinilando TRAF3, o bloqueando su

translocación (Wang et al, 2013; Xing et al, 2013; Zhang et al, 2013c y d). Además, uno de los co-receptores celulares que facilitan la entrada del HSV-1 en las células diana es un miembro de la familia de receptores para TNF (HVEM/HveA, *herpes virus entry mediator / protein A*) que se une a la glicoproteína viral gD. La expresión prominente de HVEM en los linfocitos T facilitaría su infección por HSV-1, permitiéndole contrarrestar potencialmente los efectos antivirales de los linfocitos T (Benedict y Ware, 2001).

En consonancia con el papel clave de la presentación antigénica en la defensa frente al HSV-1, son varios los mecanismos desarrollados por el virus para evadirla. En este sentido, la proteína viral ICP47 se une al TAP en las células infectadas, interfiriendo con el transporte de péptidos virales y su presentación por moléculas HLA de clase I a linfocitos T citotóxicos (Hill et al, 1995). Se ha observado también que el HSV-1, que infecta DCs inmaduras, bloquea su maduración e interfiere en su interacción con los linfocitos T, disminuyendo además la expresión de la molécula de adhesión CD83 a través de la proteína viral ICP0 (Kobelt et al, 2003; Kruse et al, 2000; Kummer et al, 2007). Asimismo, por un mecanismo todavía no esclarecido independiente de la expresión de moléculas HLA de clase II y coestimuladoras, la proteína viral ICP22 impide la presentación antigénica a linfocitos T CD4+ (Barcy y Corey, 2001). Por último, aunque formalmente no se haya implicado a las moléculas CD1 (una familia de proteínas MHC de clase Ib que presentan derivados lipídicos) en la presentación de antígenos virales, se ha observado una disminución de su expresión en células infectadas por HSV-1, lo que sugiere que también podrían jugar un papel importante en este proceso (Raftery et al, 2006).

Los múltiples efectos de los anticuerpos en la respuesta inmunitaria son también dianas para los mecanismos de inmuno-evasión del HSV-1. Las glicoproteínas virales gE y gI generan un FcγR viral (FcγRv) señuelo que podría contrarrestar tanto la ADCC, al competir con FcγR del hospedador, como la activación del complemento. En efecto, se ha demostrado un mecanismo de *antibody bipolar bridging* por el que un anticuerpo puede unirse por el paratopo a una proteína antigénica viral, y por el fragmento Fc al FcγR señuelo, ambos en la superficie de la célula infectada. De esta manera, los FcγRv, además de limitar la ADCC, impiden la unión de C1q a los inmunocomplejos, y, consecuentemente, la activación de la vía clásica del complemento (Dubin et al, 1991; Frank y Friedman, 1989; Johnson et al, 1988). Asimismo, la glicoproteína viral C puede unirse al factor del complemento C3 y bloquear la formación de las convertasas de C3 y C5 y, por tanto, la activación de todas las vías del complemento (Friedman et al, 1984; Fries et al, 1986; Kostavasili et al, 1997).

Objetivo general

Estudiar la contribución de la diversidad genética de moléculas potencialmente implicadas en la respuesta inmunitaria frente a HSV-1, a la variabilidad clínica de la infección.

Objetivos específicos

1. Analizar la influencia del polimorfismo genético del sistema HLA sobre el curso clínico de la infección por HSV-1
2. Estudiar las implicaciones de la variabilidad de los KIR y sus ligandos en la susceptibilidad a sufrir recurrencias de la infección por HSV-1
3. Diseñar un método eficiente para el genotipado del número de copias del gen que codifica para el receptor NKG2C y estudiar su influencia en la infección por HSV-1
4. Explorar el papel del polimorfismo de los complejos genéticos *FCGR* e *IGH* en la evolución clínica de la infección por HSV-1, y analizar *in vitro* su potencial contribución a la modulación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK, en el contexto de la infección por HSV-1.

Artículo 1

J Immunol 2012; 188: 4412-20.

<http://www.jimmunol.org/content/188/9/4412>

Copyright © 2012 The American Association of Immunologists, Inc.

Host genetic factors in susceptibility to Herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity

M Moraru,* E Cisneros,* N Gómez-Lozano,* R de Pablo,* F Portero,[†] M Cañizares,* M Vaquero,[‡] G Roustán,[§] I Millán,[¶] M López-Botet,^{||} and C Vilches^{2*}

*Immunogenetics-HLA, [†]Microbiology, [‡]Ophthalmology, [§]Dermatology, and [¶]Statistics Departments, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda; ^{||}DCEX, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Abstract

HSV-1 establishes life-long latency which can result in clinical relapses or in asymptomatic virus shedding. Although virtually all adults have been exposed to HSV-1, the clinical course varies remarkably. Genetic host variability could be related to this clinical diversity. In this study, we analyzed the contribution of gene families in chromosomes 1, 6, 12, and 19, which encode key regulators of the innate and adaptive immunity, in a cohort of 302 individuals. Class I and class II alleles of the HLA system, the copy-number variation of NK-cell receptor genes (*KIR* and *NKG2C*), the combinations of KIR and their HLA ligands, and CD16A and CD32A allotypes of variable affinity for IgG subclasses were all studied. Although no major susceptibility locus for HSV-1 was identified, our results show that the risk of suffering clinical HSV-1 infection is modified by MHC class I allotypes (B*18, C*15, and the group of alleles encoding A19), the high affinity receptor/ligand pair KIR2DL2/HLA-C1 and the CD16A-158V/F dimorphism. Conversely, HLA class II and CD32A polymorphisms, and *NKG2C* deletion did not seem to influence the clinical course of herpetic infection. Collectively, these findings support an important role in host defense against herpetic infection for several polymorphic genes implicated in adaptive immunity and in surveillance of its subversion. They confirm the crucial role of cytotoxic cells (CTL and NK) and the contribution of genetic diversity to the clinical course of HSV-1 infection.

Keywords: cytotoxic T cells, Fc receptors, Herpes simplex, MHC, Natural Killer cell receptors

Introduction

Most adults have suffered HSV-1 infection. The virus migrates from mucosae or skin to sensory ganglia, where it establishes life-long latent infection. Virus propagation is controlled by innate and adaptive immunity, and the course of the infection depends upon the host immune system capacity to control both the primary infection and the reactivations. HSV-1 replication in keratinocytes and mucosal cells triggers a strong cytokine response. IFN- α produced by dendritic cells (DC)³, and IFN- γ secreted by NK and, later, CD4⁺ T cells, represent a first line of direct antiviral defense (1). IFNs also promote subsequent adaptive immune response by enhancing antigen presentation (2).

CD8⁺ cytotoxic T cells (CTLs) eliminate infected cells presenting HSV-1 peptides on HLA class I molecules, and they are responsible for immunosurveillance during viral latency (3, 4). In addition, DC present viral antigens bound to HLA class II molecules to CD4⁺ T lymphocytes, which enhance differentiation and establishment of functional memory CTLs (1) and antibody-mediated control of HSV-1.

Key components of innate cellular immunity to viruses are NK cells, which kill infected cells without presensitization, secrete antiviral cytokines, and favour DC maturation. Their behaviour depends on the balance of signals transduced by activating and inhibitory receptors that survey altered molecular patterns on infected cells (5, 6). Their best-known trigger is HLA class I downregulation, monitored by several families of NK-cell receptors (7). Furthermore, NK lymphocytes exert Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against Ab-coated infected cells by means of Fc γ R.

HSV-1, like other herpesviruses, has developed mechanisms to circumvent the host immune response. Infected cell protein (ICP) ICP47 binds the transporter for antigenic peptides (TAP), thus hampering HLA class I-mediated Ag presentation by infected cells to T lymphocytes (8). Furthermore, HSV-1 glycoproteins gE and gI form an FcR on both the viral envelope and the infected cell membrane, where it can compete, directly and through Ab bipolar bridging, with host Fc γ R, protecting the infected cells from complement- and cell-mediated lysis (9).

Although virtually all adults have been exposed to HSV-1, the clinical course of the infection varies remarkably, ranging from asymptomatic virus shedding to frequent inflammatory herpetic lesions and potentially life-threatening episodes of herpetic encephalitis. Clinical variability is attributable to the virus itself (e.g. HSV-1 strains, amount of inoculum), to the environment (e.g. exposure to UV light and other triggers) and to variations in the host immune response. Herpetic encephalitis and isolated cases of fatal HSV-1 infection have been associated with rare mutations in innate

immunity-related genes (10-14). A recent linkage analysis detected in chromosome 21 a 2.5-megabase susceptibility region for herpes simplex labialis (15). However, predictive genetic markers that explain the pathogenesis of the common outcomes of HSV-1 infection are yet to be identified.

An attractive candidate to influence the course of HSV-1 infection is the enormous diversity of the HLA complex in chromosome 6, credited with a large proportion of the variability of immune responses, because it could modify the efficacy of HSV-1-antigen presentation. Several groups have analyzed the contribution of HLA allotypes to the clinical diversity of HSV-1 infection, but many results did not replicate in different populations (16-27).

Killer-cell Ig-like Receptors (KIR), encoded by a highly polymorphic gene complex in chromosome 19, represent another series of candidates to influence the HSV-1 infection outcome because they help NK cells fight viruses that tamper with HLA expression (28). The most conspicuous aspect of *KIR*-gene diversity is copy-number variation (CNV) – most humans are natural knockouts for multiple *KIR* genes, only the genes at the centromeric and the telomeric ends of the *KIR* complex being conserved. We have previously identified an association between symptomatic HSV-1 infection and presence in the genome of the linked genes *KIR2DL2* and *KIR2DS2* (29).

Also used by NK cells to sense HLA expression are CD94/NKG2 heterodimers encoded in the NK complex of chromosome 12, which comprise both activating and inhibitory receptors for HLA-E (30, 31). In sharp contrast with KIR, the *CD94* and most *NKG2* genes are well conserved (32), one remarkable exception being complete deletion of *NKG2C* (*KLRC2*) in some individuals (33, 34). The consequence of *NKG2C* deletion for immunity and health is unknown, but marked expansion of *NKG2C*-positive NK- and T-lymphocytes in response to CMV infection (35, 36) suggests a role in defense against herpesviruses.

Finally, the genes in chromosome 1 coding for the FcγR CD16A (*FCGR3A*) and CD32A (*FCGR2A*) display allelic polymorphisms that modulate their affinity for IgG (37). High-affinity FcγRs could enhance ADCC and compete with the decoy FcγR formed by HSV-1 gE/gI, thus improving the efficacy of humoral response against HSV-1.

Whether and how virus evasion mechanisms may be counteracted by host defense and to which extent immunogenetic variability contributes to the clinical outcomes of herpetic infection is yet to be established. In this study, we have analyzed the contribution of the genetic diversity of the HLA system and the KIR, NKG2C, CD16A, and CD32A receptors to the clinical variability of HSV-1 infection.

Materials and Methods

Donor and patient samples.

Three hundred two individuals, in their vast majority of Spanish origin, were interviewed about the presence and frequency of previous or actual clinical evidences of HSV-1 infection. Individuals reporting any diseases or therapies that might debilitate an immune response or symptoms doubtfully attributable to HSV-1 infection were excluded from this study; also excluded were donors seropositive for HSV-2. The total group included 253 voluntary adults and 49 patients who sought medical assistance for herpetic lesions. From the total population, 131 individuals had been included in a previous study where we analyzed the influence of the *KIR* diversity on the clinical course of the HSV-1 infection (29). In this study, we have replicated that study on *KIR* diversity in a 171-individual population with similar characteristics. Moreover, we have analyzed, in the whole sample of 302 individuals, the relationship between the outcome of HSV-1 infection and HLA, *NKG2C* and *FCGR* polymorphisms.

Venous blood samples collected from all donors were used to isolate serum and genomic DNA. Serum IgG/IgM antibodies against HSV-1+2 common antigens and HSV-2 gG2 antigen were detected by ELISA and evaluated as recommended by the manufacturer (Vircell, Granada, Spain).

Based on reported episodes of symptomatic herpes infection (most often, cold sores) after a standardized questionnaire, the total sample was subdivided into two categories: asymptomatic and symptomatic individuals. When considering the serologic findings and the frequency of HSV-1 reactivations, each of the previous groups was further separated, resulting in a total of four subcategories: (i) asymptomatic seronegatives; (ii) asymptomatic seropositives; (iii) donors with sporadic clinical reactivations (less than two reactivations yearly in the maximum activity period); and (iv) patients with recurrent reactivations (two or more per year).

HLA, KIR, NKG2C, FCGR2A and FCGR3A genotyping.

HLA class I (HLA-A, -B and -C) and class II (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5) typing was carried out using a reverse line PCR sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) test (Invitrogen-Dynal Reli-SSO, Wirral, UK). *KIR* genotyping was performed using a PCR with sequence-specific primer method designed by our group (38). On the basis of gene content, two categories of *KIR* haplotypes have been established, designated A and B. These share some *KIR* genes and pseudogenes (*3DL2*, *3DL3*, and, in most cases, *2DL4* and *3DP1*), whereas they diverge in the remaining *KIR* genes. Besides the shared 'framework' genes, the A haplotype carries:

genes coding for the inhibitory KIR 2DL1, 2DL3 and 3DL1; for KIR2DS4, as the only activator; and one pseudogene, *KIR2DP1*. By contrast, the hallmark of B haplotypes is the replacement of one or more of the latter six genes by variable combinations of *KIR* not seen in the A haplotype: *2DL2*, *2DL5*, and genes encoding activating KIR different from 2DS4. According to this, we assigned an AA genotype to individuals having all and only *KIR* genes corresponding to an A-haplotype; a BX genotype, when all the previous genes, as well as any of those characteristic of B-haplotypes, were present; and a BB-genotype when any gene of the A-haplotype was missing and one or more of those included in a B-haplotype were present. The assignment of a BX genotype was based exclusively on gene content; such designation was used instead of AB so as not to imply that the genes that form an A-haplotype were inherited in cis.

Joint KIR/ligand analysis considered the interactions of KIR 2DL1 and 2DS1 with HLA-C alleles with lysine at position 80 of the alpha chain (HLA-C2 epitope); KIR 2DL2 and 2DL3 with HLA-C alleles bearing asparagine at the same position 80 (HLA-C1 epitope); KIR3DL1 with HLA-B and HLA-A allotypes having the Bw4 epitope (excluding A*25); KIR3DL2 with HLA-A*03 and A*11 alleles; the recently demonstrated interaction of full-length KIR2DS4 with HLA-A*11 and subsets of HLA-C alleles (C*01, *02, *04, *05, *14, and *1601) (39); and KIR3DS1 with Bw4, because of its apparent genetic interaction in viral infection (40).

Homozygous and heterozygous deletion of the *NKG2C* gene were assessed by a PCR method based on the approach used by Miyashita et al. (34), with modifications (M. Moraru, M. Cañizares, A. Muntasell, R. de Pablo, M. López-Botet, C. Vilches, submitted for publication, details available upon request).

Functional polymorphisms of *FCGR2A* and *FCGR3A* were determined using a PCR with confronting two-pair primers, as described (41).

MHC Epitope prediction.

To predict HSV-1 peptide-binding to specific HLA molecules, we have used the NetCTLpan tool (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTLpan/>), which integrates information on proteasomal cleavage, TAP transport efficiency and MHC-binding affinity (42).

Statistical analysis.

Gene frequencies were estimated by direct counting and they were compared using the Fisher exact test. Influence of the activating KIR-gene number on the clinical course of HSV-1 infection was analyzed using the Mann-Whitney *U* test. The Mantel-Haenszel χ^2 test for linear trends was used to analyze cumulative influence of high

affinity KIR/ligand pairs 2DL2/C1 and 2DL1/C2; distribution of 2DL2/C1 in recurrent, sporadic and asymptomatic patients; and allele-dose effect of CD16A valine-158. A significance level of 5% was chosen.

Forward stepwise multiple logistic regression was performed, using the SPSS14 package (SPSS Inc., *Chicago, IL*), to measure the independent effect of various genetic variables on the clinical course of herpetic infection, and to build a predictive model of the probability of suffering symptomatic infection. A receiver operating characteristic (ROC) curve was used to plot sensitivity and specificity of the predictive model (43). For multiple logistic regression, we selected variables that showed differences with $P < 0.1$ in univariate analysis of their distribution in symptomatic and asymptomatic donors. To reduce the number of variables, we grouped the alleles that encode the following public HLA specificities: A9 (A*23–*24), A19 (A*29–*33), and A28 (A*68–*69). HLA-B*35, with P slightly over 0.1, was also included because of its previous identification as a protective factor, as was the *KIR2DL1/C2* combination, for its apparently cumulative effect on the risk conferred by *KIR2DL2/C1*.

Results

Cohort demographic characteristics.

We studied 302 adult individuals, of whom 164 had symptomatic HSV-1 infection and 138 were asymptomatic. The mean age of the whole sample was 40.3 ± 12.7 y, the symptomatic and the asymptomatic groups having similar ages (Supplemental Table I, Table I). Sixty-five percent of the donors were women, who predominated in the group developing clinical herpetic infection ($p = 0.002$), and, in particular, among individuals with two or more reactivations per year ($p = 0.0001$, when compared with the rest of the population). This finding is in line with previous observations on the gender distribution of patients with recurrent HSV-1 infection (44).

Table I. **Cohort demographic characteristics.**

Category	Women n (%)	Men n (%)	Mean age years (\pm s.d.)
Asymptomatics (N=138)	77 (55.8)	61 (44.2)	38.9 (\pm 11.0)
Symptomatics (N=164)	120 (73.2)	44 (26.9)	41.6 (\pm 13.9)
TOTAL N=302	197 (65.2)	105 (34.8)	40.3 (\pm 12.7)

Influence of HLA diversity on the outcome of HSV-1 infection.

To explore whether and how the extreme HLA polymorphism conditions the clinical efficacy of adaptive responses against HSV-1, we analyzed the HLA alleles of all individuals included in this study. HLA class II allotypes had remarkably similar distributions in symptomatic and asymptomatic donors (Fig. 1, Supplemental Table II). In contrast, several HLA-class I alleles displayed less even distributions in the two subgroups (Fig. 1, Supplemental Table II), although only two of the apparent differences between symptomatics and asymptomatics reached statistical significance. In particular, HLA-B*18 was overrepresented in the asymptomatic group ($p = 0.003$; odds ratio [OR], 0.34), and HLA-B*35, reported to associate negatively with herpes in Italians (19), showed a trend in the same direction (one-tailed $p = 0.075$; OR, 0.60). On the contrary, HLA-C*15 was more frequently encountered among symptomatic individuals ($p = 0.013$; OR, 4.53).

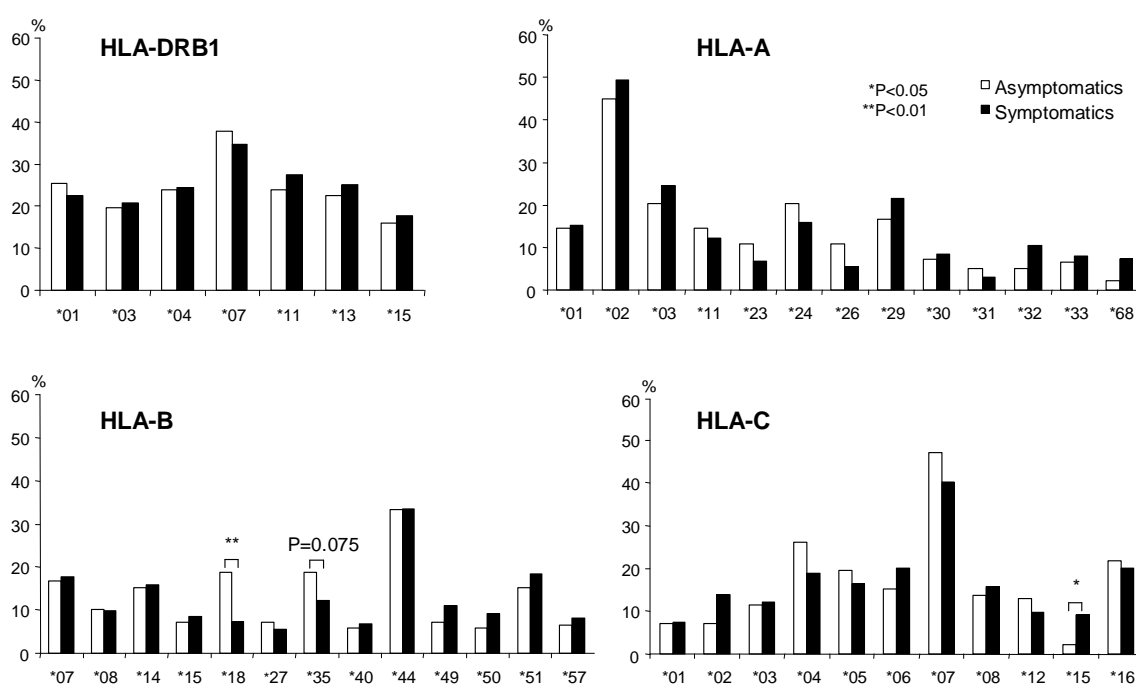


FIGURE 1. Phenotypic frequencies of common HLA alleles in symptomatic and asymptomatic individuals. Only the alleles with a frequency >5% in at least one subgroup are represented here; the exact frequencies of all studied alleles are shown in Supplemental Table II.

The most common HLA class I allotype, A*02, was slightly less represented in asymptomatic than in symptomatic donors (Fig. 1). Stratification of asymptomatic

donors for presence or absence of HSV-1-specific Abs showed that HLA-A*02 was under-represented solely in seronegative individuals (37.3%), whereas seropositive asymptomatic and symptomatic donors all had A*02 frequencies (52.1% and 49.4%, respectively) similar to those reported in Spanish individuals (45, 46), but that difference was only close to significance ($p = 0.072$ for the comparison between HSV-1 seronegatives and all other donors). Comparison of the HLA allele distribution in the four subgroups of patients showed no other significant differences (Supplemental Table II).

HSV-1 peptide binding profiles of HLA class I molecules

To identify functional differences between HLA-B*18, B*35 and C*15 that could explain their divergent influence on risk of clinical HSV-1 infection, we used a tool for peptide-binding prediction to MHC molecules (42). We focused on differences in presentation of peptides derived from immediate early HSV-1 genes, because these are transcribed upon viral entry without prior viral protein synthesis, and they encode antigens expressed in latency (47). The products of all common B*18 and B*35 alleles of Caucasoids (B*18:01, B*35:01–B*35:03, and B*35:08) were predicted to present a unique 9-mer peptide (EPAPDVWVF) from ICP0; in contrast, no ICP0-derived peptides were potential ligands for HLA-C*15 (alleles C*15:02 and C*15:05). The *ICP27* gene encodes several potential nonamer ligands for HLA-B*18 and C*15, but none for B*35. Peptides from all other immediate early gene products were similarly presented by all three MHC molecules.

Influence of KIR gene diversity on the clinical course of HSV-1 infection.

Previous analysis of *KIR*-gene CNV in 131 of the 302 donors studied in this article showed that resistance to clinical HSV-1 infection associates with the absence of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* from the genome (29). In this study, we replicated that study in another group of 171 individuals of similar characteristics and origins. We observed small deviations in the same direction (e.g. 59.8% of symptomatics, versus only 55.7% of asymptomatics, had a *KIR2DL2* gene) (Fig. 2, Supplemental Table III), but they were not statistically significant. Yet, in the total sample of 302 individuals, the increase of *KIR2DL2* and *KIR2DS2* in clinical HSV-1 infection retained statistical significance ($p = 0.011$, OR = 1.83; and $p = 0.027$, OR = 1.69, respectively). As was the case in our first study, all other *KIR* genes were distributed similarly in the symptomatic and asymptomatic subgroups of the replication sample (Fig. 2A), as well as in patients with recurrent and sporadic symptoms (data not shown).

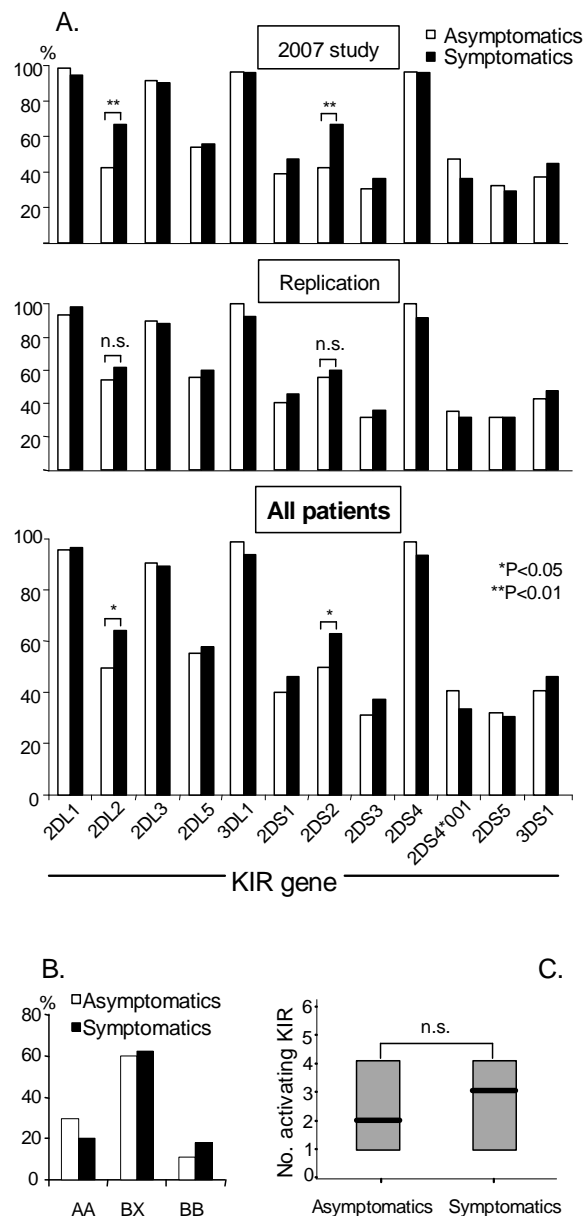


FIGURE 2. *KIR*-gene (A) and *KIR*-genotype (B) frequencies, and number of genes encoding activating KIR (C) in symptomatic and asymptomatic individuals. Each box plot represents the median and the 25th and 75th percentiles. Among *KIR2DS4* alleles, only those with a canonical structure were considered to encode an activating receptor.

On the basis of gene content, two categories of *KIR* haplotypes have been established, designated A and B, which combine into an array of diverse AA, BX, and BB genotypes, for which distribution was compared in donors with or without HSV-1 symptoms. Consistent with the observed differences in the frequencies of *KIR 2DL2* and *2DS2*, genes present only in B-haplotypes, reciprocal deviations in the frequencies of the AA and BB genotypes were seen (Fig. 2B, Supplemental Table IV), but those deviations were only close to statistical significance ($p < 0.1$).

The number of activating KIR encoded by different genotypes ranges from six to none (when *KIR2DS4* is represented in both chromosomes of an AA genotype by null alleles, dominant in white populations), and this variation might modulate the activation threshold of NK cells. However, search for possible association between the number of genes for activating KIR and the clinical course of HSV-1 infection showed no significant differences between asymptomatic donors and patients with either sporadic or recurrent symptoms (Fig, 2C and data not shown).

KIR/HLA-ligand pairs of higher avidity increase the risk of clinical HSV-1 infection.

We refined the study of *KIR* genotypes by considering the simultaneous presence of a receptor and its known or presumed ligand in the same individual. The receptor/ligand pair 2DL2/HLA-C1 was more commonly encoded in symptomatic than in asymptomatic donors ($p = 0.011$, OR = 1.87;) (Fig. 3, Supplemental Table IV). This had been originally observed in our first study (29), and was reproduced with marginal significance in the replication cohorts (58.7% vs. 45.6%; OR = 1.70; single-sided $p = 0.059$). Furthermore, when the HSV-1 reactivation rate was considered, a highly significant gradient in the 2DL2/C1 distribution was observed: its frequency was highest in patients with frequently recurrent HSV-1 reactivations and lowest in donors without symptoms ($p = 0.005$; Table II).

Table II. **Distribution of the receptor:ligand pair KIR2DL2:HLA-C1, according to HSV-1 serology and frequency of clinical reactivations.**

	2DL2:HLA-C1 frequency: % (n)
Asymptomatic seronegatives (n=67)	38.8 (26)
Asymptomatic seropositives (n=71)	43.7 (31)
Symptomatics, sporadic reactivations (n=63)	50.8 (32)
Symptomatics, recurrent reactivations (n=101)	59.4 (60)

P of linear trend: 0.005

The proportion of individuals encoding both high-affinity receptor/ligand pairs 2DL2/HLA-C1 and 2DL1/HLA-C2 is also increased among symptomatically infected individuals ($p = 0.005$; OR = 2.13), in whom lack of both receptor/ligand pairs was rarer than in asymptomatic individuals ($p = 0.032$, OR = 0.51, Fig. 3). As a consequence, presence of both, either or none of the two pairs caused a linear increase in the risk of having HSV-1 symptoms (Mantel-Haenszel chi-squared $p = 0.002$, supplemental table S4). Coincident increase of both receptors and their respective ligands in the same

group of patients is noticeable because *KIR2DL2* is often inherited in haplotypes that lack a *KIR2DL1* gene; furthermore, *C1* and *C2* are mutually exclusive allotypes of the same locus. These findings prompted analysis of *C1-C2* genotype distribution in symptomatic patients, which did not fit the Hardy-Weinberg equilibrium, and this was due to predominance of heterozygosity: 29% *C1C1*, 58% *C1C2*, 13% *C2C2* ($p = 0.017$). This distribution differed significantly from that of asymptomatic controls (38% *C1C1*, 46% *C1C2*, 17% *C2C2*, $p = 0.011$), in whom these genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. The rest of inhibitory or activating *KIR*/ligand pairs did not show significant differences in their distribution (Fig. 3 and data not shown).

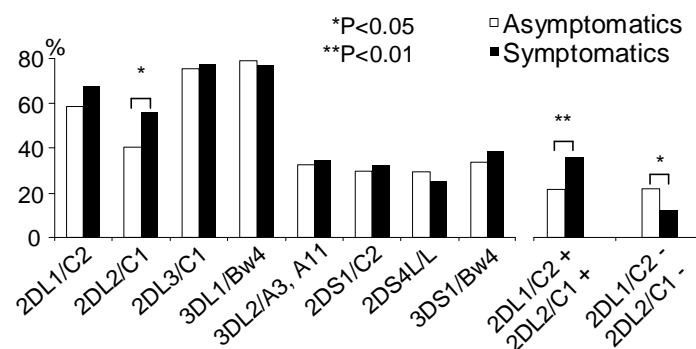


FIGURE 3. KIR/ligand pair frequencies in symptomatic and asymptomatic individuals.

The proportion of individuals encoding both or neither of the high-affinity receptor/ligand pairs, 2DL2/HLA-C1 and 2DL1/HLA-C2, are represented on the right side.

NKG2C gene deletion does not influence the clinical course of HSV-1 infection.

The gene encoding the HLA-E receptor *NKG2C*, which marks subsets of NK and T lymphocytes that expand in response to CMV, is deleted in some Asian and European individuals (33, 34); therefore we searched for possible relation between *NKG2C* deletion and poorer course of HSV-1 infection. Homozygous and heterozygous individuals for the *NKG2C* deletion were found in both the symptomatic and asymptomatic groups. The frequencies of the *NKG2C*^{+/+}, the *NKG2C*^{+/del}, and the *NKG2C*^{del/del} genotypes were identical in the two groups (Table III), and in the range seen in Japanese and Dutch (33, 34). An apparent frequency gradient of the *NKG2C*^{+/+} genotype (highest in asymptomatic seropositive donors, lowest in patients with recurrent symptoms; table III), was not statistically significant.

Table III. Distribution of *NKG2C* genotypes.

	<i>Asymptomatics</i>			<i>Symptomatics</i>		
	Seronegative (N= 67)	Seropositive (N= 70)	Total (N=137)	Sporadic (N= 63)	Recurrent (N= 100)	Total (N=163)
<i>NKG2C</i> ^{del/del}	4.5%	4.3%	4.4%	3.2%	5.0%	4.3%
<i>NKG2C</i> ^{wt/del}	43.3%	27.1%	35.0%	31.7%	35.0%	33.7%
<i>NKG2C</i> ^{wt/wt}	52.2%	68.6%	66.6%	65.1%	60.0%	62.0%

Homozygosity for the higher avidity allele of CD16A (FCGR3A) protects from clinical HSV-1 infection.

Because FcγR mediate cellular responses (ADCC, phagocytosis) against infected cells recognised by virus-specific IgG molecules, we investigated whether dimorphisms that increase the avidity for IgG of two such receptors could improve the infection outcome. The alleles encoding valine/phenylalanine-158 of CD16A (*FCGR3A*) and arginine/histidine-131 of CD32A (*FCGR2A*) were genotyped, and their frequencies in the whole sample were in the range reported for white populations (48, 49). After excluding the individuals who lacked IgG antibodies for HSV-1, comparisons showed that, as hypothesized, homozygosity for the higher affinity allele of CD16A (158V/V) was less common in patients with clinical HSV-1 infection than in seropositive individuals lacking HSV-1 symptoms (one tailed $p = 0.024$, two tailed $p = 0.037$, OR = 0.43; Fig. 4). Furthermore, the dose of allele CD16A-158V had a significant effect on protection from herpetic symptoms (Mantel-Haenszel test for linear trends $p = 0.027$; table IV). In contrast with CD16A, the CD32A-131H/R dimorphism had no appreciable influence on the clinical course of the infection (Fig. 4). No influence of either dimorphism was seen on the frequency of clinical HSV-1 reactivations (data not shown).

FIGURE 4. CD16A-158 (A) and CD32A-131 (B) genotype frequencies in symptomatic and asymptomatic individuals.

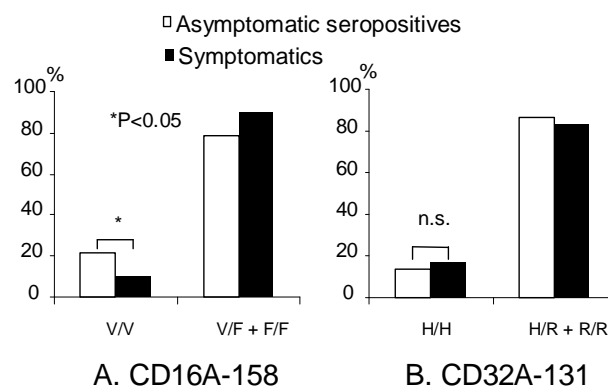


Table IV. **CD16A-158 V allele dose and protection from symptomatic HSV-1 infection.**

Genotype	Asymptomatic seropositives N=70, n (%)	Symptomatics N=163, n (%)	OR
CD16A-158 F/F	20 (28.6)	63 (38.6)	1 ¹
CD16A-158 V/F	35 (50.0)	83 (51.2)	0.75
CD16A-158 V/V	15 (21.4)	17 (10.4)	0.36

P of linear trend: 0.027

¹In the Mantel-Haenszel test for linear trends, the reference genotype is assigned an arbitrary OR value of 1, to which the OR of the other genotypes are referred. The test measures the significance of a linear relationship between an ordinal variable, the dose of a risk or protective factor (the CD16A-158 V allele), and probability of an outcome (being symptomatic).

Multiple logistic regression confirms the association of several immunogenetic factors with clinical HSV-1 infection.

Multiple logistic regression analysis was performed in order to determine the extent to which each of the possibly associated variables identified in the univariate tests contributes to clinical HSV-1 infection. This analysis revealed an independent and cumulative effect of the presence or absence of several variables on the probability to suffer symptomatic HSV-1 reactivations. These results confirmed that the presence of HLA-B*18 and a CD16A-158V/V genotype grant protection from HSV-1 reactivation, whereas HLA-C*15, the group of HLA-A alleles encoding the A19 allotype, and the KIR2DL2/C1 receptor/ligand pair (but neither *KIR2DL2* nor *KIR2DS2* alone) confer susceptibility to suffer herpetic reactivations (Table V). A predictive model on the probability of suffering herpetic lesions was built with the parameters that, in multiple regression, showed a significantly positive or negative association. Such model classified correctly 70.6% of the patients with herpetic symptoms and 58.0% of the asymptomatic donors. A ROC curve, which plots specificity and sensitivity of the model (43), enclosed 68.7% of the maximum possible area (Fig. 5).

Table V. Variables that contribute independent and significantly to the risk of symptomatic HSV-1 infection, according to multiple logistic regression analysis.

Variable	p-value	OR	(C.I. 95%)
HLA-B*18	0.003	0.31	(0.14–0.66)
HLA-C*15	0.007	5.93	(1.63–21.64)
HLA-A19	0.035	1.71	(1.04–2.82)
KIR2DL2:HLA-C1	0.002	2.15	(1.32–3.51)
CD16A-158V/V	0.017	0.42	(0.21–0.85)

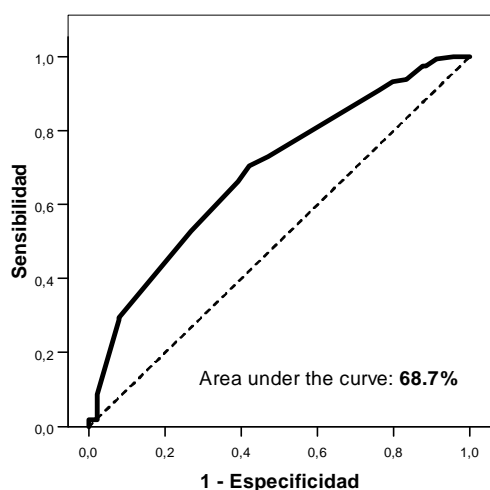


FIGURE 5. ROC curve (43), plotting the specificity and sensitivity of a predictive model on the probability of suffering herpetic lesions, built with the parameters found to contribute independent and significantly in multiple regression analysis: HLA-C*15, HLA-A19-associated alleles and the KIR2DL2/C1 pair, as risk factors; and HLA-B*18 and CD16-158V/V, as protective factors (Table 5). The diagonal line ($y = x$) corresponds to the random speculation of a class.

Discussion

The highly variable clinical course of HSV-1 infection suggests that susceptibility or resistance host genes are involved in its control, as shown for murine CMV and experimental HSV-1 infection (50, 51). However, no major HSV-1 susceptibility locus has been identified in humans, suggesting that polygenic inheritance is responsible for variable susceptibility. In this study, we have analyzed the contribution of gene families that encode key regulators at the interface of adaptive and innate immunity: class I and class II alleles of the HLA system, the CNV of NK-cell receptors (*KIR* and *NKG2C*), combinations of *KIR* and their HLA-encoded ligands, and allotypes that modulate the affinity of CD16A and CD32A for IgG. Even though none of these genes arises as a major susceptibility locus, uni- and multivariate analyzes indicate that MHC class I alleles, combinations of *KIR*/ligand pairs, and the CD16A-158V/F dimorphism all modify the risk of suffering clinical HSV-1 infection. In contrast, polymorphisms of HLA class II, *NKG2C* and CD32A appear to play no role in susceptibility to HSV-1.

Among HLA class I alleles, B*18 was significantly less common among herpetic patients, association not observed in other populations. Previous studies indicated that B35 might confer protection against HSV-1 (19, 23, 25, 27); we observed a coincident deviation, but it was only close to significance in uni- and multivariate analysis. In contrast with those HLA-B allotypes, C*15 emerged as a susceptibility factor. This allele had never been studied in HSV-1 infection, because it remained undiscovered until DNA typing methods became available in the mid-1990s (52, 53). Strong association of C*15 with B51 in Caucasoids (46) might be related to previous reports on B51 (the common split of the public antigen HLA-B5) behaving as a predisposing factor for symptomatic herpes (17, 18, 20, 26, 27). Finally, multiple regression analysis

identified the group of alleles encoding an A19 antigen as possible risk factors; similar results were obtained previously by some (16, 25, 27), but not all (19, 21), groups.

The picture that emerges from comparison of different studies is one in which MHC class I polymorphism appears consistently associated with HSV-1 infection, the predisposing or protective alleles varying in each study. Low reproducibility of results in different populations might bear relation with geographical differences in distribution and haplotypic combinations of HLA alleles. Confounding effects can also contribute to conflicting results; among them, small cohorts of <50 patients in many previous studies, control groups composed of general population instead of herpes-resistant donors, and imprecision of serological HLA typing. We have addressed these problems by studying >150 symptomatically infected individuals, and a similarly sized control group comprising only asymptomatic individuals. Furthermore, this is the first study, to our knowledge, performed entirely with DNA-based genotyping methods, of greater precision and reproducibility, and the only techniques currently accepted for HLA-C and class II alleles.

With the exception of C*15 and A*32 (part of the A19 allotype), the HLA class I alleles that appear to modify the outcome of HSV-1 infection do not encode known KIR ligands. Therefore, their divergent roles in the infection should derive from differential functions as Ag-presenting molecules to CD8⁺ CTLs. A peptide prediction tool that takes into account MHC binding, proteasomal C-terminal cleavage and TAP transport efficacy, showed that the possibly protective (HLA-B*35 and B*18) and the risk alleles (C*15 and most A19-related alleles) encode molecules that differ in their capacity to present a unique ICP0 9-mer peptide. HSV-1 ICP0, a potential target for CTLs (54, 55), is expressed during early infection and latency, and it triggers virus reactivation (47). Therefore, efficacious presentation of ICP0-derived peptides by certain HLA class I molecules could favour CTL control of infective virion production in sensory ganglia (56).

Another aspect in which MHC molecules diverge functionally is in their capacity to overcome the effect of viral immunoevasins. Independence of tapasin binding for peptide loading enables some MHC molecules, including HLA-B35 (57), to migrate more rapidly to the cell surface. Furthermore, although this characteristic is at the expense of binding suboptimal peptides, it overcomes TAP blockade by protein ICP47 during HSV-1 infection (58). Tapasin-independent HLA molecules could therefore be advantageous by presenting HSV-1 Ags early after infection/reactivation. Unfortunately, tapasin-independence cannot be currently predicted reliably from the primary structure of an HLA allotype, but B18 could share that feature with B35,

because it carries a combination of two motifs (aspartate-114 and serine-116) that associate with tapasin-independence (59-62).

Subversion of HLA class I expression in infected cells could facilitate HSV-1 evasion from CTLs, but it is also a trigger for cytotoxicity and cytokine secretion by NK cells, which sense it by means of KIR and other MHC receptors. We have previously reported that *KIR* genes *2DL2* and *2DS2* contribute to the susceptibility to suffer frequent, clinically relevant HSV-1 reactivations (29). Current results show that these genes by themselves increase only modestly the risk of symptomatic herpes. It is mainly the combination of *KIR2DL2* with HLA-C alleles encoding its epitope ligand [*KIR2DS2* lacks any detectable affinity for HLA (63)] that increases noticeably susceptibility to this disease.

KIR2DL2 is currently considered a *2DL3* allotype of higher affinity (64). Stronger inhibition by *KIR2DL2* in the presence of its cognate ligands could explain its association with symptomatic herpes, because it might render NK cells less sensitive to modest decreases in HLA-C-expression levels induced by HSV-1, and/or hamper surveillance of viral reactivations by memory CD8 T cells expressing NK receptors. Differences in KIR/ligand affinity are possibly relevant because IFN- γ could attenuate HSV-1 blockade of HLA class I expression on infected epithelial cells (65). Consistent with this model, another high-affinity receptor/ligand pair, *2DL1/C2*, further increased the risk conferred by *2DL2/C1*. According to this reasoning, association of symptomatic herpes of *KIR2DS2* would only reflect its strong linkage disequilibrium with *2DL2*. As an anecdotal evidence, *KIR* genes *2DL2* and *2DS2* segregated separately in three donors of this study – two *2DL2*⁺*2DS2*⁻ donors had HSV-1 symptoms, whereas the single *2DL2*⁻*2DS2*⁺ individual was asymptomatic.

Our study on *KIR* diversity focused on CNV, but did not take into account possible effects of allelic polymorphism. *KIR2DL2* is represented in white populations by mostly two alleles, *KIR2DL2**001 and *003 (66). Their products share the three substitutions that make *KIR2DL2* a stronger receptor than *KIR2DL3*, and differ from each other by two amino acid replacements: one in the second Ig-like domain (isoleucine/threonine-200, respectively), and one in the cytoplasmic tail (alanine/threonine-313). The former variation, located far from the ligand-binding region, seems not to modify the receptor affinity (64), but more subtle effects of those polymorphisms on *KIR2DL2* function and, hence, on its association with HSV-1 infection, cannot be excluded. Similarly, we have not considered quantitative differences in the affinity of *KIR2DL2* for various HLA-C1, and even -C2, ligands (64). Of note in the latter regard, C*15:02, the predominant C*15 allele in Spain (46, 52), encodes a C2 epitope for which *KIR2DL2* lacks affinity, and it is

recognised with average affinity by KIR2DL1 (64). Current data thus provide no clues to understand an NK cell-mediated mechanism underlying the observed association of C*15 with HSV-1 infection.

The KIR repertoire of different humans is enormously variable and variegated, not only because of gene CNV and allelic polymorphism; both the receptor density on the cell surface and the proportion of NK cells expressing each KIR vary in each individual. Regulation of the KIR repertoire is incompletely understood, and it is genetically controlled in part by KIR genes and by the HLA context (67). It is possible that certain HLA-C ligands modulate differently the contribution of KIR2DL2 to the KIR repertoire, or license to different extent the effector capacity of NK cells. Further investigation is warranted to determine whether variable usage of KIR2DL2 modulates the influence exerted on defense against HSV-1 by mere presence in the genome of the genes/alleles encoding the receptor and its ligands.

Unidentified ligands for orphan KIR could have escaped our analysis, but no other *KIR* and their known ligands associated with the clinical course of HSV-1 infection. And neither did CNV of *NKG2C*, including its homozygous deletion. Confirmation of this result would imply that this lectin-like NK receptor is redundant or plays no major role in defense against HSV-1.

Finally, the higher affinity allotype of CD16A (158V) was identified as a protective factor for symptomatic herpes. Valine-158 possibly enhances efficacy of humoral response against HSV-1 by inducing a stronger interaction of CD16A with the lower hinge of IgG (37). Importance of this interaction is illustrated by the decoy FcγR evolved by several human viruses, including HSV-1, which, reciprocally, are possibly better counteracted by competing host FcγR allotypes of higher affinity for IgG. Also supporting the importance of CD16A for defense against HSV-1 would be the association of mutations at aa 48 of CD16A with severe infections by herpesviruses, but that association is controversial (68-71). Contrasting with the protective effect of CD16A-158V is the lack of association between clinical herpes and CD32A-131 allotypes of variable affinity. Lack of association might reflect greater importance of effective NK cell-mediated cytotoxicity over phagocytosis in the elimination of HSV-1– infected cells and/or predominance of the IgG subclasses bound preferentially by CD16A in the humoral response to HSV-1.

This is, to our knowledge, the widest, hypothesis-based, immunogenetic study so far performed on susceptibility to HSV-1 infection, and it includes several genes never tested before. We have examined as many as 107 immunogenetic markers as potential risk factors for symptomatic herpes (seventy-four HLA allotypes; sixteen *KIR* genes

and genotypes; eight KIR:ligand pairs; and three *NKG2C*-, and six *FCGR* genotypes). Paradoxically, this is also a pitfall of our approach, because the high number of comparisons performed increases the probability of finding spurious associations. Following Bonferroni's correction for multiple tests would require setting a statistical significance threshold at ~ 0.0005 (0.05 divided by 107 primary comparisons). For ORs and allele frequencies in the range seen here, such confidence level could only have been achieved by studying approximately 500-1000 donors. Consequently, the newly identified associations (in particular those not suspected a priori, such as those of C*15 and B*18) should be considered preliminary until validated in other populations.

In summary, we have shown that susceptibility to clinical HSV-1 infection is modulated by polymorphism in genes encoding molecules that control the effector functions of cytotoxic T and NK lymphocytes (HLA class I, combinations of KIR and their ligands, and CD16A); whereas the course of the infection is not modified by genetic polymorphism in HLA class II and CD32A, molecules more implicated in cooperation between CD4 T cells, B lymphocytes and phagocytic cells. Collectively, our results are consistent with a crucial role of CTLs and NK cells in host defense against herpetic infection, and they show that polymorphisms in genes controlling adaptive immune responses, and surveillance of its sabotage, explain part of the variable susceptibility to HSV-1 infection. Further research is warranted to determine the extent to which diversity of innate immunity-related genes contributes to this disease.

Acknowledgements:

We are indebted to all individuals who generously donated blood samples; to the blood bank staff and other colleagues who submitted and interviewed patients and healthy voluntary donors; and to all technicians in the HLA and virology laboratories who helped in sample collection and characterisation. This work was partially supported by grants BFU2005-04622 and SAF2010-22153-C03-03, from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

1. Cunningham, A. L., R. J. Diefenbach, M. Miranda-Saksena, L. Bosnjak, M. Kim, C. Jones, and M. W. Douglas. 2006. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis.* 194 Suppl 1: S11-18.
2. Pollara, G., M. Jones, M. E. Handley, M. Rajpopat, A. Kwan, R. S. Coffin, G. Foster, B. Chain, and D. R. Katz. 2004. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. *J Immunol.* 173: 4108-4119.
3. Cose, S. C., C. M. Jones, M. E. Wallace, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1997. Antigen-specific CD8+ T cell subset distribution in lymph nodes draining the site of herpes simplex virus infection. *Eur J Immunol.* 27: 2310-2316.
4. Frank, G. M., A. J. Lepisto, M. L. Freeman, B. S. Sheridan, T. L. Cherpes, and R. L. Hendricks. 2009. Early CD4(+) T cell help prevents partial CD8(+) T cell exhaustion and promotes maintenance of Herpes Simplex Virus 1 latency. *J Immunol* 184: 277-286.
5. Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, M. C. Mingari, and A. Moretta. 2004. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol* 25: 670-676.
6. Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-274.
7. Karre, K. 1997. How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev* 155: 5-9.
8. Hill, A., P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, and D. Johnson. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature.* 375: 411-415.
9. Dubin, G., E. Socolof, I. Frank, and H. M. Friedman. 1991. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol.* 65: 7046-7050.
10. Casrouge, A., S. Y. Zhang, C. Eidenschenk, E. Jouanguy, A. Puel, K. Yang, A. Alcais, C. Picard, N. Mahfoufi, N. Nicolas, L. Lorenzo, S. Plancoulaine, B. Senechal, F. Geissmann, K. Tabeta, K. Hoebe, X. Du, R. L. Miller, B. Heron, C. Mignot, T. B. de Villemeur, P. Lebon, O. Dulac, F. Rozenberg, B. Beutler, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science.* 314: 308-312.
11. Dupuis, S., E. Jouanguy, S. Al-Hajjar, C. Fieschi, I. Z. Al-Mohsen, S. Al-Jumaah, K. Yang, A. Chapgier, C. Eidenschenk, P. Eid, A. Al Ghonaum, H. Tufenkeji, H. Frayha, S. Al-Gazlan, H. Al-Rayes, R. D. Schreiber, I. Gresser, and J. L. Casanova. 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet.* 33: 388-391.
12. Niehues, T., J. Reichenbach, J. Neubert, S. Gudowius, A. Puel, G. Horneff, E. Lainka, U. Dirksen, H. Schroten, R. Doffinger, J. L. Casanova, and V. Wahn. 2004. Nuclear factor kappaB essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol.* 114: 1456-1462.
13. Perez de Diego, R., V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, S. Plancoulaine, C. Picard, M. Herman, A. Cardon, A. Durandy, J. Bustamante, S. Vallabhapurapu, J. Bravo, K. Warnatz, Y. Chaix, F. Cascarrigny, P. Lebon, F. Rozenberg, M. Karin, M. Tardieu, S. Al-Muhsen, E. Jouanguy, S. Y. Zhang, L. Abel, and J. L. Casanova. 2010. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity.* 33: 400-411.
14. Zhang, S. Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C. L. Ku, A. Casrouge, X. X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Heron, L. Vallee, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2007. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science.* 317: 1522-1527.
15. Hobbs, M. R., B. B. Jones, B. E. Otterud, M. Leppert, and J. D. Kriesel. 2008. Identification of a herpes simplex labialis susceptibility region on human chromosome 21. *J Infect Dis.* 197: 340-346.
16. Blackwelder, W. C., R. Dolin, K. K. Mittal, P. M. McNamara, and F. J. Payne. 1982. A population study of herpesvirus infections and HLA antigens. *Am J Epidemiol* 115: 569-576.
17. Colin, J., C. Chastel, J. P. Saleun, J. F. Morin, and G. Renard. 1979. [Recurrent ocular herpes simplex infection and HLA antigens; preliminary results (author's transl)]. *J Fr Ophthalmol* 2: 263-266.

18. Damgaard-Jensen, L., N. Ehlers, and F. Kissmeyer-Nielsen. 1979. HLA types in corneal diseases. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 57: 982-985.
19. Gallina, G., V. Cumbo, P. Messina, M. A. Modica, and C. Caruso. 1987. MHC-linked genetic factors (HLA-B35) influencing recurrent circumoral herpetic lesions. *Dis Markers* 5: 191-197.
20. Jabbar, A. A., A. M. al-Samarai, and N. S. al-Amar. 1991. HLA antigens associated with susceptibility to herpes simplex virus infection. *Dis Markers* 9: 281-287.
21. Legendre, C., A. S. Russell, and M. Jeannet. 1982. HLA antigens in patients with recrudescence herpes simplex infections. *Tissue Antigens* 19: 85-89.
22. Meyers-Elliott, R. H., J. H. Elliott, W. A. Maxwell, T. H. Pettit, D. M. O'Day, P. I. Terasaki, and D. Bernoco. 1980. HLA antigens in recurrent stromal herpes simplex virus keratitis. *Am J Ophthalmol* 89: 54-57.
23. Middleton, D., T. H. Hutchison, and J. Lynd. 1983. HLA antigen frequency in erythema multiforme and in recurrent herpes simplex. *Tissue Antigens* 21: 264-267.
24. Russell, A. S., and J. Schlaut. 1975. HL-A transplantation antigens in subjects susceptible to recrudescence herpes labialis. *Tissue Antigens* 6: 257-261.
25. Russell, A. S., and J. Schlaut. 1977. Association of HLA-A1 antigen and susceptibility to recurrent cold sores. *Arch Dermatol* 113: 1721-1722.
26. Simon, M., Jr., D. Djawari, and A. Schonberger. 1984. [HLA typing of patients with herpes simplex recidivans and postherpetic erythema exsudativum multiforme]. *Z Hautkr* 59: 1087-1089.
27. Zimmerman, T. J., J. I. McNeill, A. Richman, H. E. Kaufman, and S. R. Waltman. 1977. HLA types and recurrent corneal herpes simplex infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 756-757.
28. Vilches, C., and P. Parham. 2002. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20: 217-251.
29. Estefanía, E., N. Gómez-Lozano, F. Portero, R. de Pablo, R. Solís, S. Sepúlveda, M. Vaquero, M. A. González, E. Suárez, G. Roustán, and C. Vilches. 2007. Influence of KIR-gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens* 70: 34-41.
30. Lee, N., M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. Lopez-Botet, and D. E. Geraghty. 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5199-5204.
31. Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795-799.
32. Shum, B. P., L. R. Flodin, D. G. Muir, R. Rajalingam, S. I. Khakoo, S. Cleland, L. A. Guethlein, M. Uhrberg, and P. Parham. 2002. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol* 168: 240-252.
33. Hikami, K., N. Tsuchiya, T. Yabe, and K. Tokunaga. 2003. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes Immun* 4: 160-167.
34. Miyashita, R., N. Tsuchiya, K. Hikami, K. Kuroki, T. Fukazawa, M. Bijl, C. G. Kallenberg, H. Hashimoto, T. Yabe, and K. Tokunaga. 2004. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol* 16: 163-168.
35. Gumá, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gómez-Lozano, N. Malats, and M. López-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664-3671.
36. Gumá, M., M. Budt, A. Saez, T. Brckalo, H. Hengel, A. Angulo, and M. López-Botet. 2006. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107: 3624-3631.
37. van Sorge, N. M., W. L. van der Pol, and J. G. van de Winkel. 2003. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 61: 189-202.
38. Vilches, C., J. Castaño, N. Gómez-Lozano, and E. Estefanía. 2007. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens* 70: 415-422.
39. Graef, T., A. K. Moesta, P. J. Norman, L. Abi-Rached, L. Vago, A. M. Older Aguilar, M. Gleimer, J. A. Hammond, L. A. Guethlein, D. A. Bushnell, P. J. Robinson, and P. Parham. 2009. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced

- specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med.* 206: 2557-2572.
40. Martin, M. P., X. Gao, J. H. Lee, G. W. Nelson, R. Detels, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, J. Trowsdale, M. Wilson, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 22: 22.
 41. Vilches, C., J. Castano, P. Munoz, and J. Penalver. 2008. Simple genotyping of functional polymorphisms of the human immunoglobulin G receptors CD16A and CD32A: a reference cell panel. *Tissue Antigens.* 71: 242-246.
 42. Stranzl, T., M. V. Larsen, C. Lundegaard, and M. Nielsen. 2010. NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions. *Immunogenetics.* 62: 357-368.
 43. Fawcett, T. 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 27: 861-874.
 44. Bader, C., C. S. Crumpacker, L. E. Schnipper, B. Ransil, J. E. Clark, K. Arndt, and I. M. Freedberg. 1978. The natural history of recurrent facial-oral infection with herpes simplex virus. *J Infect Dis.* 138: 897-905.
 45. de Pablo, R., C. Vilches, M. E. Moreno, M. Rementería, R. Solís, and M. Kreisler. 1992. Distribution of HLA antigens in Spanish Gypsies: a comparative study. *Tissue Antigens* 40: 187-196.
 46. Balas, A., F. Garcia-Sanchez, and J. L. Vicario. 2011. Allelic and haplotypic HLA frequency distribution in Spanish hematopoietic patients. Implications for unrelated donor searching. *Tissue Antigens* 77: 45-53.
 47. Khanna, K. M., A. J. Lepisto, V. Decman, and R. L. Hendricks. 2004. Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol.* 16: 463-469.
 48. Lehnbecher, T., C. B. Foster, S. Zhu, S. F. Leitman, L. R. Goldin, K. Huppi, and S. J. Chanock. 1999. Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood.* 94: 4220-4232.
 49. Gonzalez-Escribano, M. F., F. Aguilar, J. Sanchez-Roman, and A. Nunez-Roldan. 2002. FcγRIIA, FcγRIIIA and FcγRIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunogenet.* 29: 301-306.
 50. Lee, S. H., S. Girard, D. Macina, M. Busa, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros, and S. M. Vidal. 2001. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat Genet* 28: 42-45.
 51. Pereira, R. A., A. Scalzo, and A. Simmons. 2001. Cutting edge: a NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J Immunol.* 166: 5869-5873.
 52. Vilches, C., R. de Pablo, M. J. Herrero, M. E. Moreno, and M. Kreisler. 1993. Molecular cloning and polymerase chain reaction-sequence-specific oligonucleotide detection of the allele encoding the novel allospecificity HLA-Cw6.2 (Cw*1502) in Spanish gypsies. *Hum Immunol* 37: 259-263.
 53. Bunce, M., and K. I. Welsh. 1994. Rapid DNA typing for HLA-C using sequence-specific primers (PCR-SSP): identification of serological and non-serologically defined HLA-C alleles including several new alleles. *Tissue Antigens* 43: 7-17.
 54. Mikloska, Z., A. M. Kesson, M. E. Penfold, and A. L. Cunningham. 1996. Herpes simplex virus protein targets for CD4 and CD8 lymphocyte cytotoxicity in cultured epidermal keratinocytes treated with interferon-γ. *J Infect Dis.* 173: 7-17.
 55. Mikloska, Z., and A. L. Cunningham. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J Gen Virol* 79: 353-361.
 56. Liu, T., K. M. Khanna, X. Chen, D. J. Fink, and R. L. Hendricks. 2000. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med.* 191: 1459-1466.
 57. Thamavongsa, V., M. Schaefer, T. Filzen, K. L. Collins, M. Carrington, N. Bangia, and M. Raghavan. 2009. Assembly and intracellular trafficking of HLA-B*3501 and HLA-B*3503. *Immunogenetics.* 61: 703-716.
 58. Zernich, D., A. W. Purcell, W. A. Macdonald, L. Kjer-Nielsen, L. K. Ely, N. Laham, T. Crockford, N. A. Mifsud, M. Bharadwaj, L. Chang, B. D. Tait, R. Holdsworth, A. G. Brooks, S. P. Bottomley, T. Beddoe, C. A. Peh, J. Rossjohn, and J. McCluskey. 2004.

- Natural HLA class I polymorphism controls the pathway of antigen presentation and susceptibility to viral evasion. *J Exp Med* 200: 13-24.
59. Neisig, A., R. Wubbolts, X. Zang, C. Melief, and J. Neefjes. 1996. Allele-specific differences in the interaction of MHC class I molecules with transporters associated with antigen processing. *J Immunol* 156: 3196-3206.
 60. Park, B., S. Lee, E. Kim, and K. Ahn. 2003. A single polymorphic residue within the peptide-binding cleft of MHC class I molecules determines spectrum of tapasin dependence. *J Immunol* 170: 961-968.
 61. Turnquist, H. R., H. J. Thomas, K. R. Prilliman, C. T. Lutz, W. H. Hildebrand, and J. C. Solheim. 2000. HLA-B polymorphism affects interactions with multiple endoplasmic reticulum proteins. *Eur J Immunol* 30: 3021-3028.
 62. Williams, A. P., C. A. Peh, A. W. Purcell, J. McCluskey, and T. Elliott. 2002. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 16: 509-520.
 63. Moesta, A. K., T. Graef, L. Abi-Rached, A. M. Older Aguilar, L. A. Guethlein, and P. Parham. 2010. Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. *J Immunol* 185: 4233-4237.
 64. Moesta, A. K., P. J. Norman, M. Yawata, N. Yawata, M. Gleimer, and P. Parham. 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 180: 3969-3979.
 65. Koelle, D. M., and L. Corey. 2003. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 16: 96-113.
 66. Hou, L., M. Chen, J. Ng, and C. K. Hurley. 2012. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. *Genes Immun* 13: 47-58.
 67. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, A. M. Little, F. Partheniou, and P. Parham. 2006. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 203: 633-645.
 68. Lenart, M., E. Trzyna, M. Rutkowska, K. Bukowska-Strakova, A. Szaflarska, A. Pituch-Noworolska, A. Szczepanik, M. Zembala, and M. Siedlar. 2010. The loss of the CD16 B73.1/Leu11c epitope occurring in some primary immunodeficiency diseases is not associated with the FcγRIIIa-48L/R/H polymorphism. *Int J Mol Med* 26: 435-442.
 69. Jawahar, S., C. Moody, M. Chan, R. Finberg, R. Geha, and T. Chatila. 1996. Natural Killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol* 103: 408-413.
 70. de Vries, E., H. R. Koene, J. M. Vossen, J. W. Gratama, A. E. von dem Borne, J. L. Waaijer, A. Haraldsson, M. de Haas, and M. J. van Tol. 1996. Identification of an unusual Fc gamma receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood* 88: 3022-3027.
 71. Forbes, L. R., M. Paessler, and J. S. Orange. 2009. CD16 Deficiency Discovered in a Cohort of Patients with Severe Herpesviral Infections Using a New Diagnostic Test. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123: S67-S67.

Abbreviations used in this paper: ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; CNV, copy number variation; DC, dendritic cells; HW, Hardy-Weinberg; ICP, infected cell protein; KIR, killer-cell Ig-like receptor; OR, odds ratio; PCR-SSO, polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide; ROC, receiver operating characteristic.

Supplemental Table S1. Cohort demographic characteristics.

Category		First series (ref. 29)		Second series		Total			
		N	Mean age (\pm s.d.)	N	Mean age (\pm s.d.)	Women	Men	N	Mean age (\pm s.d.)
Asymptomatics	Seronegative	27	36.3 (\pm 8.7)	40	37.9 (\pm 11.0)	41	26	67	37.2 (\pm 10.1)
	Seropositive	32	41.1 (\pm 12.6)	39	40.1 (\pm 10.9)	36	35	71	40.5 (\pm 11.6)
	Sub-total	59	38.9 (\pm 11.2)	79	39.0 (\pm 10.9)	77	61	138	39.9 (\pm 11.0)
Symptomatics	Sporadic	20	48.4 (\pm 14.8)	43	42.1 (\pm 12.2)	37	26	63	43.9 (\pm 13.3)
	Recurrent	52	40.3 (\pm 15.9)	49	39.5 (\pm 12.2)	83	18	101	39.9 (\pm 14.2)
	Sub-total	72	42.6 (\pm 15.9)	92	40.9 (\pm 12.1)	120	44	164	41.6 (\pm 13.9)
	TOTAL	131	40.9 (\pm 14.0)	171	39.8 (\pm 12.2)	197	105	302	40.3 (\pm 12.7)

Supplemental table S2. HLA allele frequencies

Allele	Asymptomatics			Symptomatics		
	Seronegatives N= 67, n (%)	Seropositives N= 71, n (%)	All asymptomatics N=138, n (%)	Sporadic N= 63, n (%)	Recurrent N= 101, n (%)	All symptomatics N=164, n (%)
A*01	10 (14.9)	10 (14.1)	20 (14.5)	7 (11.1)	18 (17.8)	25 (15.2)
A*02	25 (37.3)	37 (52.1)	62 (44.9)	32	49 (48.5)	81 (49.4)
A*03	16 (23.9)	12 (16.9)	28 (20.3)	20	20 (19.8)	40 (24.4)
A*11	11 (16.4)	9 (12.7)	20 (14.5)	6 (9.5)	14 (13.9)	20 (12.2)
A*23	8 (11.9)	7 (9.9)	15 (10.9)	4 (6.3)	7 (6.9)	11 (6.7)
A*24	12 (17.9)	16 (22.5)	28 (20.3)	10	16 (15.8)	26 (15.9)
A*25	2 (3.0)	2 (2.8)	4 (2.9)	1 (1.6)	5 (5.0)	6 (3.7)
A*26	9 (13.4)	6 (8.5)	15 (10.9)	5 (7.9)	4 (4.0)	9 (5.5)
A*29	11 (16.4)	12 (16.9)	23 (16.7)	12	23 (22.8)	35 (21.3)
A*30	7 (10.4)	3 (4.2)	10 (7.2)	6 (9.5)	8 (7.9)	14 (8.5)
A*31	4 (6.0)	3 (4.2)	7 (5.1)	3 (4.8)	2 (2.0)	5 (3.0)
A*32	2 (3.1)	5 (7.0)	7 (5.1)	7 (11.1)	10 (9.9)	17 (10.4)
A*33	3 (4.5)	6 (8.5)	9 (6.5)	5 (7.9)	8 (7.9)	13 (7.9)
A*66	1 (1.5)	0 (0)	1 (0.7)	0 (0)	2 (2.0)	2 (1.2)
A*68	2 (3.0)	1 (1.4)	3 (2.2)	3 (4.8)	9 (8.9)	12 (7.3)
A*69	1 (1.5)	0 (0)	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A*80	0 (0)	1 (1.4)	1 (0.7)	2 (3.2)	0 (0)	2 (1.2)

Supplemental table S2 (continued)

Allele	<i>Asymptomatics</i>			<i>Symptomatics</i>		
	Seronegatives N= 67, n (%)	Seropositives N= 71, n (%)	All asymptomatics N=138, n (%)	Sporadic N= 63, n (%)	Recurrent N= 101, n (%)	All symptomatics N=164, n (%)
B*07	14 (20.9)	9 (12.7)	23 (16.7)	12	17 (16.8)	29 (17.7)
B*08	4 (6.0)	10 (14.1)	14 (10.1)	8 (12.7)	8 (7.9)	16 (9.8)
B*13	3 (4.5)	3 (4.2)	6 (4.3)	4 (6.3)	3 (3.0)	7 (4.3)
B*14	8 (11.9)	13 (18.3)	21 (15.2)	9 (14.3)	17 (16.8)	26 (15.9)
B*15	3 (4.5)	7 (9.9)	10 (7.2)	5 (7.9)	9 (8.9)	14 (8.5)
B*18	13 (19.4)	13 (18.3)	26 (18.8)	6 (9.5)	6 (5.9)	12 (7.3)
B*27	6 (9.0)	4 (5.6)	10 (7.2)	6 (9.5)	3 (3.0)	9 (5.5)
B*35	11 (16.4)	15 (21.1)	26 (18.8)	8 (12.7)	13 (12.9)	20 (12.2)
B*37	2 (3.0)	0 (0)	2 (1.4)	2 (3.2)	1 (1.0)	3 (1.8)
B*38	2 (3.0)	3 (4.2)	5 (3.6)	4 (6.3)	2 (2.0)	6 (3.7)
B*39	2 (3.0)	2 (2.8)	4 (2.9)	1 (1.6)	3 (3.0)	4 (2.4)
B*40	3 (4.5)	5 (7.0)	8 (5.8)	3 (4.8)	8 (7.9)	11 (6.7)
B*41	1 (1.5)	2 (2.8)	3 (2.2)	3 (4.8)	2 (2.0)	5 (3.0)
B*44	26 (38.8)	20 (28.2)	46 (33.3)	19	36 (35.6)	55 (33.5)
B*45	4 (6.0)	1 (1.4)	5 (3.6)	4 (6.3)	0 (0)	4 (2.4)
B*47	2 (3.0)	0 (0)	2 (1.4)	0 (0)	1 (1.0)	1 (0.6)
B*48	1 (1.5)	0 (0)	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
B*49	6 (9.0)	4 (5.6)	10 (7.2)	6 (9.5)	12 (11.9)	18 (11.0)
B*50	2 (3.0)	6 (8.5)	8 (5.8)	3 (4.8)	12 (11.9)	15 (9.1)
B*51	10 (14.9)	11 (15.5)	21 (15.2)	13	17 (16.8)	30 (18.3)
B*52	2 (3.0)	1 (1.4)	3 (2.2)	1 (1.6)	3 (3.0)	4 (2.4)
B*53	0 (0)	1 (1.4)	1 (0.7)	3 (4.8)	1 (1.0)	4 (2.4)
B*55	0 (0)	3 (4.2)	3 (2.2)	0 (0)	3 (3.0)	3 (1.8)
B*56	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.6)	2 (2.0)	3 (1.8)
B*57	6 (9.0)	3 (4.2)	9 (6.5)	0 (0)	13 (12.9)	13 (7.9)
B*58	1 (1.5)	1 (1.4)	2 (1.4)	0 (0)	3 (3.0)	3 (1.8)
B*67	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.6)	0 (0)	1 (0.6)
B*78	0 (0)	1 (1.4)	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Supplemental table S2 (continued)

Allele	Asymptomatics			Symptomatics		
	Seronegatives N= 67, n (%)	Seropositives N= 71, n (%)	All asymptomatics N=138, n (%)	Sporadic N= 63, n (%)	Recurrent N= 101, n (%)	All symptomatics N=164, n (%)
C*01	6 (9.0)	4 (5.6)	10 (7.2)	4 (6.3)	8 (7.9)	12 (7.3)
C*02	5 (7.5)	5 (7.0)	10 (7.2)	9 (14.3)	14 (13.9)	23 (14.0)
C*03	6 (9.0)	10 (14.1)	16 (11.6)	6 (9.5)	14 (13.9)	20 (12.2)
C*04	16 (23.9)	20 (28.2)	36 (26.1)	12	19 (18.8)	31 (18.9)
C*05	15 (22.4)	12 (16.9)	27 (19.6)	10	17 (16.8)	27 (16.5)
C*06	10 (14.9)	11 (15.5)	21 (15.2)	11	22 (21.8)	33 (20.1)
C*07	30 (48.8)	35 (49.3)	65 (47.1)	24	42 (41.6)	66 (40.2)
C*08	7 (10.4)	12 (16.9)	19 (13.8)	9 (14.3)	17 (16.8)	26 (15.9)
C*12	8 (11.9)	10 (14.1)	18 (13.0)	7 (11.1)	9 (8.9)	16 (9.8)
C*14	2 (3.0)	3 (4.2)	5 (3.6)	3 (4.8)	3 (3.0)	6 (3.7)
C*15	2 (3.0)	1 (1.4)	3 (2.2)	8 (12.7)	7 (6.9)	15 (9.1)
C*16	19 (28.4)	11 (15.5)	30 (21.7)	15	18 (17.8)	33 (20.1)
C*17	1 (1.5)	2 (2.8)	3 (2.2)	1 (1.6)	1 (1.0)	2 (1.2)
DRB1*01	15 (22.4)	20 (28.2)	35 (25.4)	10	27 (26.7)	37 (22.6)
DRB1*03	13 (19.4)	14 (19.7)	27 (19.6)	14	20 (19.8)	34 (20.7)
DRB1*04	11 (16.4)	22 (31.0)	33 (23.9)	11	28 (27.7)	39 (23.8)
DRB1*07	28 (41.8)	24 (33.8)	52 (37.7)	21	35 (34.7)	56 (34.1)
DRB1*08	3 (4.5)	3 (4.2)	6 (4.3)	2 (3.2)	1 (1.0)	3 (1.8)
DRB1*09	3 (4.5)	1 (1.4)	4 (2.9)	1 (1.6)	3 (3.0)	4 (2.4)
DRB1*10	5 (7.5)	1 (1.4)	6 (4.3)	4 (6.3)	2 (2.0)	6 (3.7)
DRB1*11	15 (22.4)	18 (25.4)	33 (23.9)	24	21 (20.8)	45 (27.4)
DRB1*12	0 (0)	1 (1.4)	1 (0.7)	2 (3.2)	2 (2.0)	4 (2.4)
DRB1*13	15 (22.4)	16 (22.5)	31 (22.5)	16	25 (24.8)	41 (25.0)
DRB1*14	2 (3.0)	2 (2.8)	4 (2.9)	2 (3.2)	3 (3.0)	5 (3.0)
DRB1*15	15 (22.4)	7 (9.9)	22 (15.9)	11	18 (17.8)	29 (17.7)
DRB1*16	4 (6.0)	2 (2.8)	6 (4.3)	1 (1.6)	5 (5.0)	6 (3.7)
DRB3	40 (59.7)	45 (63.4)	85 (61.6)	45	64 (63.4)	109 (66.5)
DRB4	38 (56.7)	41 (57.7)	79 (57.2)	28	60 (59.4)	88 (53.7)
DRB5	18 (26.9)	9 (12.7)	27 (19.6)	12	23 (22.8)	35 (21.3)

Supplemental table S3. *KIR*-gene frequencies.

Gene ¹	First series (ref. 29)			Replication series (this study)			Total			
	Asymptomatics N=59, n (%)	Symptomatics N=72, n (%)	p	Asymptomatics N=79, n (%)	Symptomatics N=92, n (%)	p	Asymptomatics N=138, n (%)	Symptomatics N=164, n (%)	p	Total N=302, n (%)
<i>KIR2DL1</i>	58 (98.3)	68 (94.4)	n.s.	74 (93.7)	90 (97.8)	n.s.	132 (95.7)	158 (96.3)	n.s.	290 (96.0)
<i>KIR2DL2</i>	25 (42.4)	48 (66.7)	0.005	43 (54.4)	57 (62.0)	n.s.	68 (49.3)	105 (64.0)	0.011	173 (57.3)
<i>KIR2DL3</i>	54 (91.5)	65 (90.3)	n.s.	71 (89.9)	81 (88.0)	n.s.	125 (90.6)	146 (89.0)	n.s.	271 (89.7)
<i>KIR2DL5</i>	32 (54.2)	40 (55.6)	n.s.	44 (55.7)	55 (59.8)	n.s.	76 (55.1)	95 (57.9)	n.s.	171 (56.6)
<i>KIR3DL1</i>	57 (96.6)	69 (95.8)	n.s.	79 (100)	85 (92.4)	n.s.	136 (98.6)	154 (93.9)	n.s.	290 (96.0)
<i>KIR2DS1</i>	23 (39.0)	34 (47.2)	n.s.	33 (41.8)	43 (46.7)	n.s.	56 (40.6)	77 (47.0)	n.s.	131 (43.4)
<i>KIR2DS2</i>	25 (42.4)	48 (66.7)	0.005	44 (55.7)	55 (59.8)	n.s.	69 (50.0)	103 (62.8)	0.027	172 (57.0)
<i>KIR2DS3</i>	18 (30.5)	26 (36.1)	n.s.	25 (31.6)	33 (35.9)	n.s.	43 (31.2)	61 (37.2)	n.s.	104 (34.4)
<i>KIR2DS4</i>	57 (96.6)	69 (95.8)	n.s.	79 (100)	84 (91.3)	n.s.	136 (98.6)	153 (93.3)	n.s.	289 (95.7)
<i>KIR2DS4*001</i>	28 (47.4)	26 (36.1)	n.s.	28 (35.4)	29 (31.5)	n.s.	56 (40.6)	55 (33.5)	n.s.	111 (36.7)
<i>KIR2DS5</i>	19 (32.2)	21 (29.2)	n.s.	25 (31.6)	29 (31.5)	n.s.	44 (31.9)	50 (30.5)	n.s.	94 (31.1)
<i>KIR3DS1</i>	22 (37.3)	32 (44.4)	n.s.	34 (43.0)	44 (47.8)	n.s.	56 (40.6)	76 (46.3)	n.s.	132 (43.7)
<i>KIR2DP1</i>	58 (98.3)	67 (93.1)	n.s.	74 (93.7)	90 (97.8)	n.s.	132 (95.7)	157 (95.7)	n.s.	289 (95.7)

¹The framework genes that mark the ends (*KIR3DL3* and *KIR3DL2*) and the middle (*KIR3DP1* and *KIR2DL4*) of the *KIR* complex were conserved in all donors, and they are not represented here.

Supplemental table S4. **KIR genotypes and joint KIR/ligand frequencies.**

Supplemental table S4: KIR genotypes and joint KIR/HLA frequencies.				
KIR genotype	Asymptomatics N=138, n (%)	Symptomatics N=164, n (%)	p	Total N=302, n (%)
AA	41 (29.7)	33 (20.1)	n.s.	74 (24.5)
BX	82 (59.4)	102 (62.2)		184 (60.9)
BB	15 (10.9)	29 (17.7)		44 (14.6)
KIR and HLA ligands				
2DL1:C2	81 (58.7)	111 (67.7)	0.119	192 (63.6)
2DL2:C1	57 (41.3)	92 (56.1)		149 (49.3)
2DL3:C1	104 (76.1)	127 (77.4)	0.011	231 (76.5)
3DL1:Bw4	109 (79.0)	127 (77.4)	n.s.	236 (78.1)
3DL2:A*03/A*11	45 (32.6)	57 (34.8)	n.s.	102 (33.8)
2DS4*001:ligands	37 (26.8)	40 (24.4)	n.s.	77 (25.5)
3DS1:Bw4	46 (33.3)	62 (37.8)	n.s.	108 (35.8)
2DS1:C2	41 (29.7)	54 (32.9)	n.s.	95 (31.5)

Cumulative effect of 2DL2:C1 and 2DL1:C2 on susceptibility to clinical HSV-1 infection

	Asymptomatics N=138, n (%)	Symptomatics N=164, n (%)	OR
Neither 2DL2:C1 nor 2DL1:C2	30 (21.7)	21 (12.8)	1 ¹
Either 2DL2:C1 or 2DL1:C2	78 (56.5)	83 (50.6)	1.52
Both 2DL2:C1 and 2DL1:C2	30 (21.7)	60 (36.6)	2.86

P of linear trend: 0.002

¹An arbitrary OR value of 1 is assigned to the reference genotype in the Mantel-Haenszel test for linear trends.

Assessment of copy-number variation in the *NKG2C* receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction

M Moraru,¹ M Cañizares,¹ A Muntasell,² R de Pablo,¹ M López-Botet,^{2,3} and C Vilches¹.

¹Laboratorio de Inmunogenética-HLA, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid; ²IMIM-Hospital del Mar Research Institute, Barcelona; and ³DCEX, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Abstract

Natural Killer and T-lymphocytes monitor HLA-E expression through CD94:NKG2 heterodimers. Structural polymorphism is not a hallmark for NK-complex genes on chromosome 12, except for complete *NKG2C* deletion in some humans. We present a method for fast, simple and accurate assessment of *NKG2C* copy-number variation – presence or absence in the genome of an *NKG2C* gene, in homo- or heterozygosis, is detected by a single conventional polymerase chain reaction that yields amplicons of different lengths in each genotype. We have also determined the *NKG2C* genotypes of a reference cell panel comprising 13 NK- and tumor-cell lines and 39 Epstein-Barr virus transformed cells from the International Histocompatibility Workshop. Our results should facilitate research on the importance of *NKG2C* and its deletion for immunity.

Key words: copy number variation, gene deletion, genotyping, human, NK cell receptors, polymerase-chain reaction

Natural Killer (NK) cells and CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes (CTL) are key components of the cellular immune response to infections and tumours. While CTLs recognize target cells in an antigen-dependent manner, NK cells detect and kill, without previous sensitization, cells displaying altered molecular patterns. Mammal NK cells sense major histocompatibility complex (MHC) expression through at least four families of receptors, all of which include both activating and inhibitory members. Paired inhibitory/activating receptors are believed to balance NK-cell behaviour in the presence of a potential target cell, and an important set of these receptors are also expressed on CTLs (1). Inhibitory MHC receptors are fundamental to the missing self model of NK-cell regulation (2). In contrast, the role of their activating counterparts in immunity is obscure – whilst some may recognise pathogen-encoded (3) or -modified molecules, most activating homologues of inhibitory MHC receptors have self or unknown ligands.

One of the human families of MHC receptors comprises CD94:NKG2 heterodimers of the C-type lectin-like superfamily encoded in the NK complex (NKC) on chromosome 12p12-13 (4). Three homologous genes of this complex, *NKG2A* (*KLRC1*), *NKG2C* (*KLRC2*), and *NKG2E* (*KLRC3*), code for NKG2 molecules that complex with CD94; the first two heterodimers have been formally shown to recognize human leukocyte antigen (HLA)-E molecules presenting the leader peptides of other HLA class I products (5, 6). Whereas CD94/NKG2A transmits an inhibitory signal, the CD94/NKG2C and -E heterodimers are activating receptors.

NKG2C is expressed on subsets of NK- and T-lymphocytes, which expand to variable extent in response to cytomegalovirus (CMV) (7-10). Expansions of NKG2C⁺ cells have also been observed concomitantly with other viral infections (8, 11-13), but they appear to be also associated to CMV. The manner in which NKG2C⁺ lymphocytes contribute to cellular immunity to CMV is so far unknown.

Contrasting with the enormous variability of the *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor* complex on chromosome 19, the NKC on chromosome 12 is mostly conserved in terms of gene content and allelic polymorphism. An exception is NKG2C – although it shows only modest polymorphism (14, 15), complete deletion of *NKG2C* (*KLRC2*) has been described in two different populations of Asian and Caucasoid origins (15, 16). Up to 32.4% of the studied cohorts carried this deletion in heterozygosis and about 4% completely lacked *NKG2C*. Thus far, this gene deletion has not been related to any

functional feature and only a very limited number of studies have analysed its possible influence on human health (16-18). Enabling large population studies could help to shed light into this yet largely unexplored area of knowledge.

Polymerase-chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) is a fast, simple and reliable method for genotype assignment (19). Alleles or highly homologous genes are discriminated in this technique by means of appropriate sets of oligonucleotide primers that target distinctive single-nucleotide polymorphisms under stringent PCR conditions. The integrity of each individual PCR is usually warranted by an internal positive control band, amplified from a conserved gene by an additional primer pair. Previous studies have used PCR-SSP methods to study either the presence in the genome of an *NKG2C* gene, or the gene arrangement resulting from its deletion (7, 14-16, 20).

We aimed at improving the assessment of *NKG2C* copy-number variation by designing a simpler and more comprehensive method that showed, in a single reaction, either presence or deletion of *NKG2C*. To that end, we adapted the PCR-SSP technique and designed a single-tube PCR with two pairs of oligonucleotides per test. Two primers (KLRdelF and KLRdelR, Table 1) are specific for the intergenic regions flanking *NKG2C* and generate a 411-bp amplicon only in carriers of an *NKG2C* deletion, in whom the two regions come to close proximity (16); whereas a second primer pair (KLRFg669 and KLRR+135, Table 1) amplifies, in DNAs having a *NKG2C* gene, a 201-bp fragment from exon 6 and its 3'untranslated region (Figure 1). The target sequences of these primers are, according to the entries currently deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ databases, non-polymorphic to ensure that all carriers of a *NKG2C* gene, irrespective of the allele they bear, generate the expected 201-bp PCR product. To enhance specificity, all four primers recognise unique *NKG2C* sequences seen in none of its highly similar paralogues.

From every individual, the multiplex reaction always amplifies one or both of the possible amplicons, therefore it does not require an additional primer pair serving as an internal positive control. The amplicons thus generated can then be separated and distinguished, without further manipulation, by their different electrophoretic mobilities in agarose gels (Figure 1). This way, small DNA amounts and only few hours are required to analyse up to 95 samples in a single assay, using conventional thermocyclers and appropriate electrophoresis chambers.

Table 1. Oligonucleotide primers used for detecting the *NKG2C* gene and its deletion^a

Primer name	μM	Sequence (5'-3')	Amplicon
KLRdelF ^a	1	ACTCGGATTTCTATTTGATGC	411 bp
KLRdelR ^a	1	ACAAGTGATGTATAAGAAAAAG	
KLRFg669	0.25	CAGTGTGGATCTTCAATG	201 bp
KLRR+135	0.25	TTTAGTAATTGTGTGCATCCTA	

^aCopy-number variation of *NKG2C* was assessed using a single-tube PCR with two pairs of oligonucleotides per DNA. In each reaction, 100 ng of genomic DNA were amplified in 10 μl of PCR buffer (67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.01% Tween-20 and 100 mM deoxyribonucleotide triphosphates) containing 0.3 U of Taq polymerase (Bioline, London, UK). The concentration of each primer was adjusted empirically and may need local re-adjustment so that bands of similar intensities are produced by each primer pair. We have used PTC-200 and PTC-100 (MJR, Watertown, MA) thermocyclers in the following PCR conditions: 2 min at 95°C, then 10 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at 60°C and 30 s at 72°C and 20 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at 56°C and 30 s at 72°C. Five microliters of the amplification products were electrophoresed in 2% agarose gels with 1X SybrSafe solution until bromophenol blue migrated ~3 cm, and they were revealed by UV exposure.

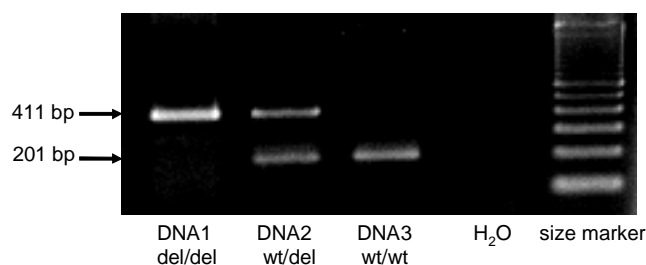


Figure 1. *NKG2C* genotyping. Amplification patterns seen with DNA samples of donors with different genotypes. From left to right, lane 1, homozygote for *NKG2C* deletion (del/del); lane 2, heterozygote (wt/del); lane 3, common type homozygote (wt/wt); lane 4, contamination control; lane 5, molecular weight marker, 100-bp ladder.

Flow cytometric analyses on blood samples from healthy individuals with different *NKG2C* genotypes detected no *NKG2C*⁺ cells in *NKG2C*-deletion homozygotes assessed with the method presented herein, irrespectively of their serological status for HCMV. In contrast, variable proportions of NK cells were stained with a specific monoclonal antibody in individuals with one or two copies of the *NKG2C* gene (manuscript in preparation). Examples of flow cytometry analyses performed in blood

samples from three healthy individuals with different *NKG2C* genotypes are shown in Figure 2.

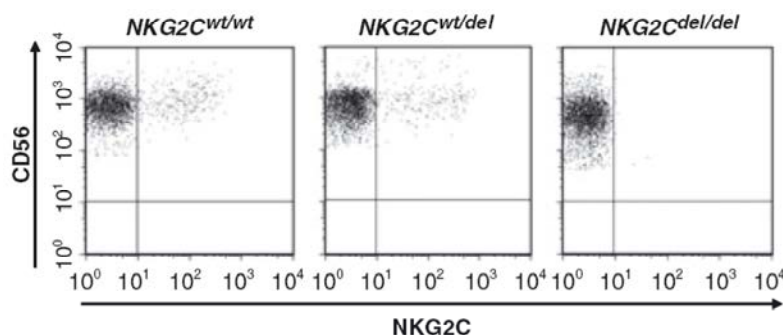


Figure 2. Expression of NKG2C in peripheral blood NK cells of three CMV-seronegative individuals harbouring different *NKG2C* genotypes, assessed by multicolour flow cytometry. NKG2C was analyzed in CD56⁺CD3⁻ cells from the lymphocyte gate upon staining with anti-NKG2C-Phycoerythrin (clone 134591, R&D, Minneapolis, MN), anti-CD3-peridin-chlorophyll-protein, and anti-CD56-allophycocyanin (BD, Biosciences, San Diego, CA). Samples were acquired on a FACSCalibur Cytometer, and CellQuest software was used for data analysis (BD Biosciences). Surface NKG2C was undetectable in NK cells from *NKG2C*^{del/del} CMV-seropositive donors (not shown).

The consequence of *NKG2C* deletion has scarcely been investigated. Research on *NKG2C* copy-number variation is hampered by a lack of appropriate control DNAs. To solve this difficulty, we used our method to characterise worldwide available cell lines that should serve as an *NKG2C*-genotyped reference panel. This panel comprises 52 cells, including: (i) 39 Epstein-Barr virus transformed B-lymphoblastoid cell lines (B-LCLs) from the International Histocompatibility Workshop, a well-characterized reference cell panel for the HLA and the Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor genes; (ii) four NK cell lines; and (iii), nine common tumour cells of haemopoietic and non-haemopoietic lineages (Table 2). All three possible genotypes (*NKG2C*^{wt/wt}, *NKG2C*^{wt/del} and *NKG2C*^{del/del}) are represented by at least four cells of this panel, which should allow access to appropriate control DNAs to laboratories willing to study the copy number variation of *NKG2C*. The amplicons derived from six cell lines (two for each genotype) were tested by direct sequencing to rule out possible cross-amplification of undesired *NKG2* genes. We further validated the method by excluding the possibility that presence of a single amplicon could be a false-negative result due to preferential amplification in an *NKG2C*^{wt/del} individual. To that end, ten DNAs with apparent *NKG2C*^{wt/wt} and another ten genotyped as *NKG2C*^{del/del}, were assayed with both the primer pair recognising *NKG2C* and that specific for its deletion in two

separate regular PCR-SSP assays. In all twenty samples, both primer pairs yielded separately results identical to those obtained when they were combined in the same tube (not shown).

Table 2. An *NKG2C*-genotyped reference cell panel.

IHW B-LCLs (no.)				Other cell lines	
<i>NKG2C</i> genotype: wt/wt		<i>NKG2C</i> genotype: wt/del		<i>NKG2C</i> genotype: wt/wt	
AMALA	9064	CB6B	9060	NK3.3	NK cell line
BH	9046	DUCAF	9019	NK92	NK cell line
BM16	9038	HOM-2	9005	NKL	NK cell line
BM21	9043	HOR	9053	YT	NK cell line
BOLETH	9031	KT12	9073	JURKAT	T cell leukemia
COX	9022	LE023	9267	RPMI 8866	B-lymphoblastoid
DBB	9052	MZ070782	9002	HeLa	Cervix carcinoma
DEU	9025	PLH	9047	DU145	Prostate carcinoma
E4181324	9011	RSH	9021		
IBW9	9049	SPOO10	9036		
JBUSH	9035	TEM	9057	<i>NKG2C</i> genotype: wt/del	
JESTHOM	9004	WDV	9062	HEK-293T	Embryonic kidney
KAS116	9003	WT24	9015	LICR-LON-HMy-2	leukemia-derived B-cell line
LUY	9070	WT51	9029		
OLGA	9071			<i>NKG2C</i> genotype: del/del	
PAR	9266				
PE117	9028	<i>NKG2C</i> genotype: del/del		K562	Erythroleukemia
PITOUT	9051	BRI-P	9044	RAJI	Burkitt Lymphoma
RML	9016			721.221	derived from B-LCL
SWEIG	9037				IHW 9249
T7527	9077				
TAB089	9066				
WT8	9017				
YAR	9026				

PCR-SSP methods combine simplicity and efficacy, as they require minimum amounts of reagents and time for accurate allele assignment. We present here a variant of such method for the determination of *NKG2C* copy-number variation. With the proposed approach, similar to one used previously to study copy-number variation of the *LILRA3* gene in multiple sclerosis (21), DNA fragments corresponding to both the complete and the deleted genotypes are detected simultaneously in a single PCR reaction, further facilitating the analysis of large DNA collections. Such fast and robust method should enable research on the role of *NKG2C* in innate and adaptive immunity, and help to establish the importance of its copy-number variation for human health.

References

1. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 225-74.
2. Karre K. How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev* 1997; **155**: 5-9.
3. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002; **296**: 1323-6.
4. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001; **181**: 20-38.
5. Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 5199-204.
6. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; **391**: 795-9.
7. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004; **104**: 3664-71.
8. Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, et al. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis* 2006; **194**: 38-41.
9. Gumá M, Budt M, Saez A, et al. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 2006; **107**: 3624-31.
10. Monsivais-Urenda A, Noyola-Cherpitel D, Hernandez-Salinas A, et al. Influence of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire in children. *Eur J Immunol* 2010; **40**: 1418-27.
11. Beziat V, Dalgard O, Asselah T, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C(+) NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol* 2011; **42**: 447-57.
12. Bjorkstrom NK, Lindgren T, Stoltz M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* 2011; **208**: 13-21.
13. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog* 2011; **7**: e1002268.
14. Shum BP, Flodin LR, Muir DG, et al. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol* 2002; **168**: 240-52.
15. Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes Immun* 2003; **4**: 160-7.
16. Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, et al. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol* 2004; **16**: 163-8.
17. Thomas R, Low HZ, Kniesch K, Jacobs R, Schmidt RE, Witte T. Nkg2c Deletion Is a Risk Factor of Hiv Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; doi:10.1089/AID.2011.0253.
18. Moraru M, Cisneros E, de Pablo R, et al. Host genetic factors in susceptibility to Herpes Simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2012; **188**: 4412-20.
19. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 2503-16.
20. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; **7**: 753-63.
21. Ordóñez D, Sánchez AJ, Martínez-Rodríguez JE, et al. Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients. *Genes Immun* 2009; **10**: 579-85.

Acknowledgments

This work was funded by grant SAF2010-22153-C03, from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*. A.M. is supported by the AECC Foundation. The authors declare no conflict of interest.

Artículo 3

Aceptado para publicación, J Immunol 2015

Copyright © 2015 The American Association of Immunologists, Inc.

NK cells and immunoglobulins interplay in defense against Herpes simplex virus type 1: epistatic interaction of CD16A and IgG1 allotypes of variable affinity modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity and susceptibility to clinical reactivation.

Manuela Moraru,* Laurel E. Black,[†] Aura Muntasell,[‡] Francisca Portero,[§] Miguel López-Botet,[‡] Hugh T. Reyburn,[¶] Janardan P. Pandey,[†] and Carlos Vilches*

Departments of *Immunogenetics-HLA and [§]Microbiology, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain; [†]Department of Microbiology and Immunology, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, United States of America; [‡]IMIM-Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona, Spain; [¶]Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.

Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latently infects most humans, causing a variable clinical picture, which depends in part on host genetic factors. Both IgG and its cellular Fc receptors CD16A and CD32A–C (encoded by genes *FCGR3A* and *FCGR2A–C*, respectively, on chromosome 1) display polymorphisms that could affect their defensive function. Of potential relevance are: a *FCGR3A* dimorphism resulting in CD16A-valine/phenylalanine-158 allotypes with different IgG affinity; variations conditioning NK-cell expression of CD32B or CD32C; and IgG1 heavy-chain (*IGHG1*) and kappa-chain (*IGKC*) polymorphisms determining allotypes designated G1m and Km. In this study we assessed the contribution of immunoglobulin genetic variations and their interaction with FcR polymorphism, to HSV-1 susceptibility, and their impact on NK-cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Our results show an epistatic interaction between *IGHG1* and *FCGR3A*, genotype G1m3/3 associating with an asymptomatic course of HSV-1 infection only in homozygotes for higher-affinity CD16A-158V, and vice versa. Furthermore, CD16A-158V and G1m3 allotypes enhanced ADCC against opsonized, HSV-1-infected, fibroblasts. Conversely, Km allotypes and CD32B or CD32C expression on NK cells did not significantly influence HSV-1 susceptibility or ADCC. NK cells degranulating against immune serum-opsonized, HSV-1-infected fibroblasts had heterogeneous phenotypes. Yet, enhanced ADCC was observed among NK cells showing a differentiated, memory-like phenotype (NKG2C^{bright}NKG2A[−]CD57⁺FcRγ[−]), which expand in response to human cytomegalovirus. These results extend knowledge on the importance of immunogenetic polymorphisms and NK-cell-antibody interplay in host response against HSV-1, and point to the relevance of interactions between immune responses elicited during chronic co-infection by multiple herpesviruses.

Introduction

Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infects most individuals, establishing life-long latency with periodical reactivations that result in clinical relapses or asymptomatic virus shedding. Although exposure to HSV-1 is virtually universal in adults, the clinical course of the infection varies largely, which depends in part on host genetic factors, including polymorphisms at the interface of innate and adaptive immunity, like those of KIR and their HLA ligands and the IgG receptor CD16A (1-3). Viral replication is controlled by both branches of the immune response, of which key components are human NK cells. This lymphocyte subset exerts both cytokine production and cellular toxicity and its behavior in the presence of a target cell depends on the balance of activating and inhibitory signals transduced by multiple NK-cell receptors (4). HSV-1-specific antibodies are detectable approximately one month after primary infection and are life-lasting. The great majority of seropositive individuals carry antibodies of IgG1 subclass, while in only about half of them HSV-specific IgG3 is detected, HSV-IgG4 and HSV-IgG2 being rare findings (5). These specific antibodies have a demonstrated neutralizing activity and readily mediate complement-dependent and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (5). Yet, their presence in virtually all infected individuals does not prevent sporadic or recurrent episodes of symptomatic reactivation in up to half of them.

Several mechanisms help HSV-1 to evade the host immune system (6). Among these, HSV-1 glycoproteins E and I (gE/gI) form a viral receptor for the crystallizable fraction of immunoglobulins (vFcγR), which binds human IgG1, 2 and 4 with different affinities and is expressed on both the viral envelope and the infected cell membrane (7-11). The gE/gI decoy vFcγR does not transmit any activating signal but it can hamper host cell FcγR and C1q binding to immune complexes, thus protecting the infected cells from ADCC, complement-dependent neutralization and phagocytosis.

ADCC, a major pathway in the clearance of pathogens, depends on simultaneous binding of IgG molecules to infected cells and to FcγR expressed on a variety of effector cells, most importantly NK cells (12). Essential for cellular immune response to antigen-bound IgG are low-intermediate affinity receptors for the Fc of IgG. Among these, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B and CD32C are encoded by five genes (named *FCGR3A–B* and *FCGR2A–C*, respectively) clustered in ~150.000 bp on the long arm of chromosome 1 – the *FCGR* locus. Several of these genes display functional polymorphism, including both sequence and copy-number variation (13, 14). Whereas CD32A (*FCGR2A*) is expressed mainly on myeloid leukocytes and CD16B (*FCGR3B*) on polymorphonuclear cells, potentially relevant for NK cell-mediated ADCC are genetic variations involving three of the *FCGR* genes (*FCGR2B*, *FCGR2C* and

FCGR3A, coding for CD32B, CD32C and CD16A, respectively) that can be expressed on these cells. CD16A, the major FcγR on NK cells (hence, in ADCC), is expressed on the great majority of CD3⁺CD56^{dim} lymphocytes in all healthy individuals. By contrast, only a minority of humans have NK cells expressing the activating FcγR CD32C, due to a single nucleotide polymorphism in exon 3 or a splice-site mutation in intron 7 determining premature termination of the *FCGR2C* reading frame on both chromosomes of most individuals (15, 16). Furthermore, a recently described ~70-kbp deletion in the *FCGR* cluster, involving *FCGR2C*, *HSPA7* and *FCGR3B* genes, has been shown to determine ectopic NK-cell expression of inhibitory CD32B (normally, a B-cell and myeloid lineage receptor) (15, 17). Finally, a functional allelic dimorphism in the *FCGR3A* gene, which encodes CD16A, generates allotypes with different affinity for IgG (18) – a valine change for phenylalanine 158, residue interacting with the lower hinge region of IgG (19, 20), increases the receptor affinity for IgG1 and IgG3 and allows binding of IgG4.

Both the changes in the affinity for IgG and NK-cell expression of additional FcγR besides CD16A, or its lack, might influence the ADCC efficacy. Indeed, previous studies have related the development of autoimmune processes with functional polymorphisms in both *FCGR3A* and *FCGR2C* (14, 21), and with lack of CD16B expression (22, 23), likely due to the *FCGR3B* deletion that determines ectopic CD32B expression on NK cells. Paradoxically, possible influence of FcγR polymorphism on defense against viral infection has been insufficiently explored; in this regard, we have previously shown that homozygosis for the higher affinity allele CD16A-158V associates with an asymptomatic course of HSV-1 infection, whilst CD32A-131H/R dimorphism does not (2).

IgG allotypes, determined by polymorphic residues on the constant region of heavy and light chains, also modulate avidity of the FcγR-IgG interaction and could influence through additional mechanisms efficacy of a humoral response (24). Indeed, several of these genetic markers have been associated with autoimmunity, malignant diseases and susceptibility to infection (24-26) and could also modulate the immune response to HSV-1. Twenty six Ig allotypes have been identified in humans, of which twenty are determined by polymorphisms in the gamma heavy chain locus (*IGHG*, Gm allotypes), and three are found on the kappa light chain (Km1, Km2 and Km3) (27). Polymorphic residues on the gamma1 heavy chain determine six different IgG1 allotypes (G1m1, G1m2, G1m3, G1m17, G1m27 and G1m28). As linkage disequilibrium between G1m allotypes within a racial group is almost absolute, G1m genetic markers are inherited in fixed haplotypes. G1m common haplotypes in Caucasoids carry either G1m3 (arginine 214, normally linked to glutamate 356 and methionine 358) or G1m17,1 (lysine 214,

aspartate 356, leucine 358) (27). Of note, G1m3 binds to the HSV-1-encoded FcγR with lower affinity than G1m1,17 (7), leading to hypothesize a differential risk to develop HSV-1-driven disease determined by these allotypes (28). Furthermore, affinity-binding assays found slightly but consistently higher affinity of both CD16A-158V and -158F for G1m3, compared to G1m17,1 allotype (29).

In the current study, we aim at extending knowledge on the influence of the *FCGR* cluster genetic variation and other immunogenetic factors on immunity to HSV-1. To that end, we analyze the contribution of the major IgG1 and kappa chain allotypes, and their interaction with FcγR allelic variants, to the clinical course of HSV-1 infection. Furthermore, using an *in-vitro* setting of HSV-1 infection, we study the functional influence of IgG1 and CD16A allotypes, and of CD32B and CD32C NK-cell expression, on NK cell-mediated ADCC.

Materials and methods

Subjects and samples

Two hundred and twenty six healthy individuals were selected from a previously studied cohort (2), based on the presence of specific IgG antibodies against HSV-1 and clinical HSV-1 manifestation, or the lack of them. A group of sixty-five seronegative subjects were also studied as controls for several genetic markers and their genotypes distributions did not differ from those of seropositive individuals (Suppl. Table). Frozen DNA, serum and PBMC samples previously extracted from venous blood after informed consent were used for genotyping and functional studies, respectively. When required, new blood samples were obtained and PBMCs were isolated by density gradient separation using Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway).

For ADCC experiments, we selected PBMCs from ten donors carrying a CD16A-158V/V genotype and another ten with a CD16A-158F/F genotype. Additionally, sera from ten donors were selected – two seronegative and eight seropositive for HSV-1; of these, four with G1m3/3 and four with G1m17/17 genotypes. Pairs of G1m3/3 and 17/17 sera were made ensuring that both sera of each pair had similar specific anti-HSV-1 IgG titers on ELISA tests (Vircell, Granada, Spain). Serum isolated from these subjects was heat inactivated and frozen in individual aliquots for each ADCC experiment. For the assessment of CD32B and CD32C influence on NK-cell mediated ADCC against HSV-1 infected targets we selected twelve individuals with different CD32B/C genotypes and expression patterns (four donors with each of the following genotypes: CD32B⁻/CD32C⁻, CD32B⁺/CD32C⁻ and CD32B⁻/CD32C⁺, Suppl. figure).

For phenotype analysis of degranulating NK cells, we selected six individuals displaying neatly identifiable expansions of NKG2C^{bright} NK cells.

Genotyping

For the determination of IgG1 markers G1m3 and 17 (a G to A substitution determining an arginine to lysine change at residue 214 of the CH1 region), we used a TaqMan® genotyping assay from Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). In brief, the assay includes a PCR with primers 5'-cccagacctacatctgcaacgtga-3' (forward) and 5'-ctgccctggactgggactgcat-3' (reverse), which specifically amplify a 161 bp fragment of the *IGHG1* gene; and probes that discriminate the single nucleotide polymorphism: VIC-ctctcaccaactttctgt-NFQ (G1m17-specific) and FAM-ctctcaccaactctctgt-NFQ (G1m3-specific). A PCR-restriction fragment-length polymorphism-based approach (30) was used to identify Km1 and Km3 allotypes. Three alleles – Km1, Km1,2, and Km3 – segregate at the Km locus in *IGKC*. Km1 allele, without Km2, is extremely rare; over 98% of the individuals positive for Km1 are also positive for Km2. Here, and in most other publications, positivity for Km1 includes both Km1 and Km1,2 alleles.

FCGR cluster polymorphism was analyzed with a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The *FCGR*-specific MLPA assay includes gene-specific probes designed to determine the copy-number variation in *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, *FCGR3B*, as well as *HSPA6* and *HSPA7* which lay in the same gene cluster, thus allowing for a highly accurate prediction of ectopic CD32B expression on NK cells. Furthermore, it also contains probes for multiple single nucleotide polymorphisms in *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* and *FCGR3B* genes, including those encoding CD16A-158V/F and CD32A-131H/R dimorphisms, and determining a premature stop codon in *FCGR2C*. Therefore, this method further validated our original results on CD16A-158V/F and CD32A-131H/R genotyping using a PCR method with confronting two-pair primers, as previously published (2, 31).

Cell lines, virus and antibodies

Human telomerase reverse transcriptase-immortalized (hTERT) HCA2 dermal fibroblasts (HCA2 hTERT, HLA-A*01, B*08,*41, C*07,*17, kindly provided by Dr. Gavin Wilkinson, University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK) and BHK21 cells (a gift from Dr S. Efstathiou, Department of Pathology University of Cambridge) were grown in DMEM (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS, penicillin and streptomycin. The 49-44 cell line was grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 0.6 mg/mL G418 and 4 mg/mL puromycin.

To ensure high viability of infected fibroblasts as stimulators of ADCC we used, unless stated otherwise, a gH-null HSV-1 mutant, dh1a, derived from HSV-1 strain 17 (32). Dh1a stocks were prepared and titered in 49-44 cells, a complementing cell line expressing gH. In selected experiments we used sΔUS8, gE⁻ mutant derived from SC16 HSV-1 strain (33) (kindly provided by Dr Helena Browne, Department of Pathology, University of Cambridge); this virus was titred on both HCA2 hTERT and BHK21 cell lines. Viral infections were performed with a multiplicity of infection of 10, conditions under which >95% of fibroblasts were infected, as confirmed by flow cytometry assays using anti-gE antibody (clone H600, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and anti-ICP4 (hybridoma 58S (34), purchased from ATCC) (data not shown).

Degranulation of NK cells was assessed with anti-CD107a-PE-Cy5 (clone H4A3), anti-CD56-ECD and anti-CD3-FITC (clone UCHT1) and (clone N901/HLDA6) from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Surface expression of FcγRs and other NK cell receptors was analyzed using anti-CD16-FITC (clone NKP15, BD Biosciences, San Diego, CA), anti-CD32B/C clone 2B6 (purchased from LCG Standards, Middlesex, UK, and used as culture supernatant), anti-CD57-PE (clone hNK-1, BD Biosciences) or anti-CD57-VioBlue (clone hNK-1, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE), anti-NKG2C-PE (clone 134591, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-NKG2A-FITC (clone REA110, Miltenyi Biotec), anti-CD3-PE-Cy7 (clone SK7, Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-CD56-APC (clone CMSSB, EBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD107a-APC-Cy7 (clone 1D4B, Biolegend), anti-FcεR1γ subunit (Millipore, Temecula, CA, USA), PE-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse Ig, PE-conjugated F(ab')₂ goat anti-rabbit Ig and PerCP-conjugated F(ab')₂ goat anti-rabbit Ig (Jackson, ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). For vFcR-blocking experiments we tried two different monoclonal anti-gE antibodies (clones H600, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA and M612452, Abcam, Cambridge, U.K.) and purified rabbit IgG (Jackson, ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) aggregated at 63°C for 20 minutes; blocking was assessed by comparing binding of human serum obtained from two different HSV-1 seronegative individuals to HSV-1 infected fibroblasts in the presence or absence of anti-gE antibodies.

Functional assays

Cryopreserved PBMCs were thawed and rested overnight in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, glutamine, penicillin and streptomycin. HCA2 hTERT cells were infected with dh1a HSV-1 strain for 2 hours, then washed with PBS to remove unadsorbed virus and cultured overnight in DMEM supplemented with 10% FBS, glutamine, Penicillin and Streptomycin. The next day, fibroblasts were harvested using a 5 mM EDTA

solution in PBS. Infected or uninfected HCA2 hTERT cells were cultured with PBMCs and 0.5% of heat-inactivated human serum in 96-well round bottom plates for 2 hours at 37°C. PBMC numbers were adjusted to achieve an effector:target (i.e. NK cells:fibroblasts) ratio of 1:1. When indicated, 30 minutes incubation with blocking antibodies preceded co-culture of HCA2 hTERT infected fibroblasts with PBMCs. Each experiment was performed with PMBCs from two age-matched individuals with opposed CD16A-158V/F genotypes in parallel, and serum from at least one seronegative and two seropositive individuals with G1m3/3 and G1m17/17 allotypes, respectively.

As the presence of CD32B or CD32C on NK cells from some individuals might influence the ADCC potency, we selected the paired samples for the functional assays ensuring that both individuals in each pair either lacked or expressed at similar levels CD32C on their NK cells, and that no individual carrying a CD16A-158F/F allotype expressed the inhibitory Fc receptor CD32B. In line with this, all selected donors had two copies of FCGR3A, and comparable CD16A baseline expression levels.

NK cell degranulation was assessed by four-color flow cytometry using an Epics XL-MCL Flow Cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL) and analyzed with Expo 32 ADC software (Beckman Coulter). The memory-like phenotype of degranulating NK cells was assessed by eight-color flow cytometry using a MACSQuant Analyzer and MACSQuantify software (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE). Percentages of degranulating NK cells were obtained by selecting CD107a⁺ from CD56^{dim}CD3⁻ lymphocytes, or from specific subsets of these cells (gating details in Suppl. figure). Background degranulation levels, attributable to natural cytotoxicity against infected fibroblasts, were assessed in all ADCC experiments in presence of serum lacking HSV-1-specific IgG (mean value 8.7%, range 2.5%–19.6%); all reported percentages of degranulating NK cells are the result of subtracting this background from degranulation levels obtained in presence of HSV-1 immune sera.

A possible confounding effect derived from interference of KIR2DL2 and its HLA-C1-ligands (associated with HSV-1 disease) in ADCC assays was doubly controlled. First, through normalization of degranulation levels by subtracting natural cytotoxicity, as described above; in addition, we used multiple pairs of NK-cell donors with divergent CD16A-158 genotypes such that both, neither or one of the donors could have NK cells educated by KIR2DL2 and C1 (as ascertained by presence of both factors in their genomes). In no experiment did these KIR/ligand phenotype combinations modify the predominance of the ADCC response exerted by CD16A-158V/V over CD16A-158F/F NK cells (see Results section).

Statistical analysis

Gene frequencies were estimated by direct counting, and they were compared using the Fisher exact test. The non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare NK cell degranulation between different subgroups. A significance level of 5% was chosen. A two-sided p value was always chosen, unless otherwise stated.

Forward stepwise multiple logistic regression was used to measure the independent effect on HSV-1 disease of the joint presence of a CD16A-158V/V and G1m3/3 allotypes, and of another five previously identified susceptibility and protection genetic markers (SPSS14 package, SPSS, Chicago, IL).

Results

IgG1 heavy-chain and Kappa light-chain allotypes (G1m3/17 and Km1/3) do not independently associate with symptomatic HSV-1 reactivation

Immunoglobulins allelic polymorphisms could, either by themselves or through interaction with other genes, modify the defense against infection. To assess their possible influence on HSV-1-driven host response, and extend our previous analysis on immunogenetic factors affecting susceptibility to the pathogen, we genotyped the two main heavy-chain allotypes of IgG1, a major component of the humoral response against HSV-1, in symptomatic and asymptomatic seropositive individuals. The frequencies of G1m3 and G1m17 allotypes in our study group (Suppl. table) were similar to those previously reported in Caucasoids (35, 36) and G1m polymorphism alone did not associate significantly with the clinical course of HSV-1 infection (G1m3/3 frequency in asymptomatic and symptomatic, seropositive individuals was 55.88% and 51.27%, respectively, OR=0.83, n.s.; Figure 1A and Suppl. Table).

We also explored association of the major light-chain allotypes with HSV-1 disease, and possible interactions with G1m allotypes. Assessment of the distribution of Km allotypes showed that 17.25% of individuals with HSV-1 antibodies carried Km1 (Suppl. Table), in line with the published frequencies for this allotype in Caucasoids (35, 36). Again, neither Km allotypes alone, nor their combination with G1m, were found to influence significantly susceptibility to HSV-1 (Suppl. Table).

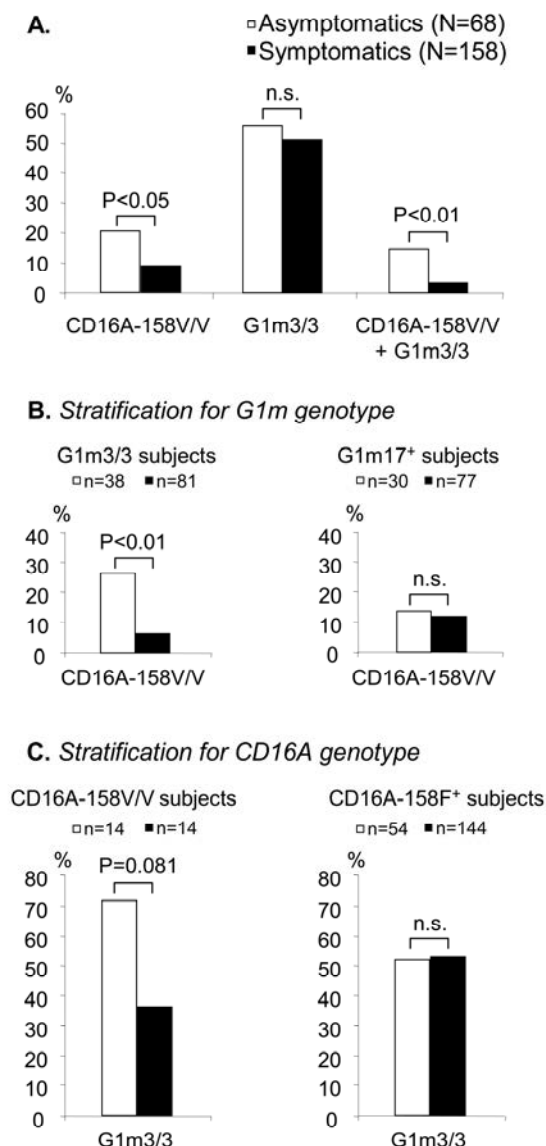


FIGURE 1. Combined association of CD16A-158V and G1m3 allotypes with clinical HSV-1 recurrence. A. CD16A-158V/V, G1m3/3 and the combined G1m3/3+CD16A-158V/V genotype frequencies in symptomatic and asymptomatic individuals. B and C. Stratification of CD16A-158V/V frequency for G1m genotypes, and vice versa, respectively. Fisher exact test was used to compare frequencies between subgroups.

Epistatic interaction between the genes encoding IgG1 and its CD16A receptor: a higher-affinity CD16A-158V/V genotype protects from clinical HSV-1 reactivations only in G1m3/3 individuals.

Previous analysis of CD16A-158V/F dimorphism in a cohort that included the 226 donors studied here showed that homozygosity for the higher-affinity CD16A-158V allele was more common in subjects without clinically manifest HSV-1 reactivation than in symptomatic patients (2). To evaluate whether the apparently protective effect of CD16A-158V (higher affinity for IgG) might be modified by the G1m3 allotype (lower affinity for vFcyR and higher affinity for CD16A), we analyzed the joint effect of both polymorphisms in our study population. Indeed, homozygosity for both CD16A-158V and G1m3 associated negatively with a symptomatic course of HSV-1 infection (OR vs. all other genotypes: 0.19; $p=0.003$) more strongly than CD16A-158V/V alone (OR: 0.38, $p=0.017$) (Figure 1A). Furthermore, stratification for IgG1 allotypes revealed that the CD16A-158V/V genotype was protective against clinical HSV-1 reactivations only in

presence of a G1m3/3 genotype (OR=0.19; $p=0.003$, Figure 1B), but not in its absence (OR=0.97, n.s.). Reciprocally, the G1m3/3 genotype was also underrepresented among symptomatically infected individuals when its distribution was analyzed in the subgroup of 28 individuals carrying a CD16A-158V/V genotype, but the small sample size of CD16A-158V/V donors prevented reaching a statistically valid conclusion (OR=0.22, n.s., Figure 1C); in contrast, G1m3/3 was equally frequent among symptomatic and asymptomatic donors with other CD16A-158 genotypes (OR=1.04, n.s.).

Our previously published study showed that, by contrast with CD16A-158V/F, CD32A-131H/R dimorphism did not modify HSV-1 susceptibility (2). In line with that result, the combined presence of genotypes G1m3/3 (lower vFcyR affinity) and CD32A-131H/H (higher IgG2 and IgG3 affinity) had no appreciable influence on the probability to suffer clinical HSV-1 recurrences (Suppl. Table). Similarly, stratification for Km allotypes revealed no new, unsuspected interactions of these with the genes encoding CD16A and CD32A (Suppl. Table).

Genetic polymorphisms determining CD32B or CD32C expression on NK cells do not modify the risk to suffer HSV-1 reactivations

By contrast with CD16A, expressed on most NK cells of all healthy humans, only a minority of individuals express the low affinity IgG receptors CD32B and/or CD32C on NK cells, which is controlled by genetic polymorphisms. These are, therefore, potential candidates to influence immunity to HSV-1. To test this hypothesis, we used multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to genotype the *FCGR* cluster. The frequencies of CD32C^{ORF} (determined by the absence of two point mutations in the *FCGR2C* gene – c37C>T and G>A at the donor splice-site in intron 7) and the *FCGR* ~70-kbp deletion conditioning CD32B ectopic expression on NK cells (CD32B^{NK} henceforth) are shown in Suppl. Table. *FCGR2C*-genotype frequencies approached those previously observed in Caucasoids (21, 37), whereas the distribution of CD32B^{NK}-related genotypes had, to our knowledge, never been reported. Neither CD32C^{ORF} nor CD32B^{NK} showed any appreciable association with herpetic susceptibility (OR=1.11 and OR=0.79, respectively, n.s.) (Figure 2). In agreement with previously published data (37), we found strong linkage disequilibrium between CD32C^{ORF} and CD16A-158V ($D=0.025$, $D'=0.61$, $p<0.001$). To rule out that association of the latter dimorphism with HSV-1 protection might reflect one of a CD16A-CD32C haplotype, we analyzed CD32C^{ORF} frequencies in the presence and absence of CD16A-158V/V and vice versa but, again, we found no new significant associations with the risk to suffer HSV-1 recurrences (not shown).

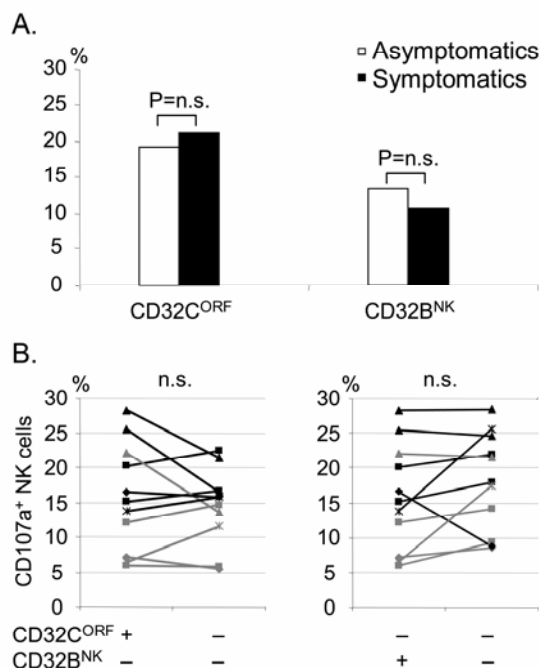


FIGURE 2. Analysis of relationship of FCGR2C and FCGR2B genotypes conditioning CD32C and CD32B expression on NK cells with HSV-1 disease (A) and ADCC (B). A. The frequencies of CD32C^{ORF} (determined by the absence of two point mutations in the FCGR2C gene – c37C>T and G>A at the donor splice-site in intron 7) and of a ~70-kbp deletion conditioning CD32B ectopic expression on NK cells (CD32B^{NK}) in symptomatic and asymptomatic individuals are shown. The exact frequencies of each genotype are shown in Supplemental Table. Fisher exact test

was used to compare frequencies between subgroups. B. CD107a expression on NK cells from individuals carrying the same CD16A-158 genotype, but different CD32B/CD32C genotypes and expression patterns (CD32B⁻/CD32C⁻, CD32B⁺/CD32C⁻ and CD32B⁻/CD32C⁺), in ADCC experiments against opsonized, HSV-1 infected fibroblasts. Experiments were performed with PBMCs from twelve individuals (four for each of the CD32B⁻/CD32C⁻, CD32B⁺/CD32C⁻ and CD32B⁻/CD32C⁺ genotypes), tested against infected fibroblasts opsonized with serum from two donors each carrying G1m3/3 and G1m17/17 genotypes. The non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare NK cell degranulation between different subgroups. In black, results from donors with CD16A-158V/V genotype; in grey, results from donors with CD16A-158F/F genotype.

Multiple logistic regression confirms the independent contribution of the CD16A-G1m interaction to the risk of clinical HSV-1 reactivation

We have previously shown that a series of polymorphic key regulators of cytotoxic lymphocytes response modify the clinical course of HSV-1 infection, namely the CD16A-158V/V genotype; the NK-cell receptor-ligand pair KIR2DL2:HLA-C1; and certain HLA class I allotypes (2). Moreover, a multiple logistic regression model performed in that study supported an independent and cumulative effect of those genetic markers on the clinical course of the HSV-1 infection (2). To confirm the association presently found in univariate tests, we performed a new logistic regression analysis. Its results validated the observed protective effect of the joint presence of the CD16A-158V/V and G1m3/3 allotypes (rather than CD16A-158V/V alone) on the probability to suffer symptomatic HSV-1 reactivations, and its independency from the other variables previously found to influence susceptibility to HSV-1 (Table 1).

Table 1. Multiple logistic regression analysis results showing variables that contribute independent and significantly to the risk of symptomatic HSV-1 infection.

Variable	p-value	OR	(C.I. 95%)
CD16A-158V/V+G1m3/3	0.001	0.15	(0.04–0.48)
HLA-C*15	0.044	8.39	(1.06–66.58)
HLA-A19	0.041	1.96	(1.03–3.72)
KIR2DL2:HLA-C1	0.027	2.00	(1.08–3.70)
HLA-B*18	0.006	0.28	(0.11–0.69)

CD16A and IgG1 polymorphism modulates NK-cell degranulation in an in vitro setting of HSV-1 infection.

The protection from clinical HSV-1 reactivation apparently conferred by the joint presence of the CD16A-158V/V and G1m3/3 genotypes could be determined by enhanced NK cell-mediated ADCC against HSV-1 infected cells in those subjects carrying this combined genotype, but such functional effect of *IGHG1* and *FCGR* polymorphisms has, to our knowledge, never been demonstrated in infection. To test this hypothesis, we evaluated degranulation of NK cells from individuals with either CD16A-158V/V or -158F/F genotypes, after *in vitro* stimulation with HSV-1 infected fibroblasts and HSV-1-immune sera with different IgG1 allotypes. In all experiments, irrespective of CD16A and IgG1 allotypes, NK-cell degranulation in the presence of sera with HSV-1-specific IgG largely exceeded the results obtained with sera lacking those antibodies, representing natural cytotoxicity levels against infected targets.

In line with the observed association of the CD16A-158V/V genotype with better course of HSV-1 infection, significantly more NK cells from CD16A-158V/V donors degranulated against opsonized HSV-1⁺ cells, as compared to NK cells from CD16A-158F/F individuals cultured in similar conditions ($p < 0.001$) (Figure 3A). Of note, this was the case in presence of both G1m3/3 and G1m17/17 sera ($p < 0.001$), despite epidemiological CD16-158V/V association with lack of HSV-1 disease only in presence of the former G1m genotype. Furthermore, although our association study found no significant influence of G1m genotypes on resistance to HSV-1, G1m3/3 sera triggered in all cases significantly more NK-cell degranulation in ADCC than G1m17/17 ones ($p < 0.001$) (Figure 3B). Again, stratification for CD16A revealed that such effect of IgG1 genotype was exerted on NK cells expressing either a high- or a low-affinity allele of the FcγR ($p < 0.001$).

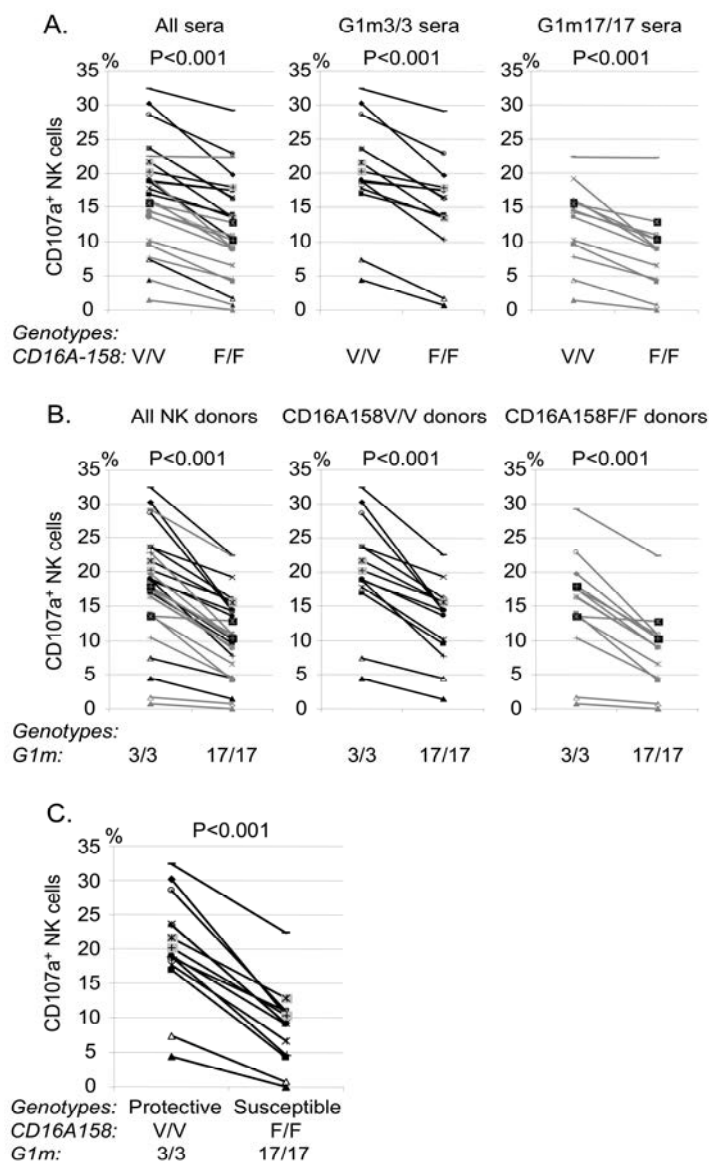


Figure 3. Influence of CD16A-158 and G1m genotypes on NK-cell degranulation in an in vitro setting of ADCC against opsonized HSV-1+ targets. A. Percentages of degranulating NK cells in paired experiments using PMBCs from CD16A-158V/V and CD16A-158F/F donors. In black, results obtained with G1m3/3 sera, in grey, results obtained with G1m17/17 sera. B. Percentages of degranulating NK cells in paired experiments using sera from G1m3/3 and G1m17/17 individuals with similar HSV-1-specific IgG titers. In black, results from donors with CD16A-158V/V genotype; in grey, results from donors with CD16A-158F/F genotype. C. Percentages of degranulating CD16A-158V/V NK cells in the presence of G1m3/3 sera ('protective' genotype),

compared with CD16A-158F/F NK cells in the presence of G1m17/17 sera ('susceptible' genotype). In all cases, natural cytotoxicity (estimated by degranulation seen in presence of serum lacking HSV-1-specific IgG) has been subtracted in order to show degranulation specifically induced by ADCC. Experiments were performed with PBMCs from ten different individuals carrying each CD16A-158 allotype in homozygosis, tested against infected fibroblasts opsonized with serum from two (6 experiments) or four (6 experiments) paired donors, based on their IgG1 genotype. The non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare NK cell degranulation between different subgroups.

The previous experiments defined CD16A and IgG1 genotypes associated with more potent ADCC and/or a milder course of HSV-1 infection. The interaction of both polymorphisms allows defining combined genotypes of theoretical maximal protection (CD16A-158V/V+G1m3/3) and maximal susceptibility (CD16A-158F/F+G1m17/17).

Comparison of such combined extreme genotypes in ADCC assays revealed in every experiment higher NK-cell response when PBMCs from individuals carrying CD16A-158V/V genotype were cultured with G1m3/3 sera, as compared to NK cells expressing lower-affinity CD16A-158F/F cultured with serum containing G1m17/17 IgG1 ($p < 0.001$) (Figure 3C). On average, the presence of a combined susceptibility genotype reduced the percentage of CD107a⁺ NK cells by 65.3% (range: 31.2%–100%) relative to the combined protective genotype. Of note, differences between degranulation levels of NK cells with each CD16A-158 genotype were consistently seen in all donor combinations, regardless of whether cells derived from donors having or lacking a KIR2DL2/HLA-C1 receptor-ligand pair, associated with HSV1 disease (not shown).

Modulation of ADCC efficacy by CD16A/IgG1 polymorphism is partially independent of viral FcγR and CD32B/CD32C expression on NK cells

The observed differences in ADCC intensity determined by IgG1 major allotypes might be due to G1m3/3 IgG having lower binding affinity for vFcγR, higher affinity for CD16A or both. To assess the contribution of the decoy vFcγR, we aimed to analyze in its absence the effect of IgG1 allotypes on NK-cell degranulation. Viral FcγR-blocking experiments were unsuccessful since the capacity of infected cells to bind human IgG was efficaciously abolished by neither aggregated rabbit IgG (capable of binding to the HSV-1 FcγR (10)) nor two commercially available monoclonal antibodies against HSV-1 gE, (data not shown). As an alternative approach, we used HSV-1 gE[−] mutant strain sΔUS8 to infect target fibroblasts. These were then exposed to NK cells and immune sera of different genotypes, and the results were compared with those obtained with gE⁺ HSV-1. As it can be appreciated in Figure 4, comparison between degranulation induced by G1m3/3 and 17/17 sera showed greater variability with the gE[−] than with the gE⁺ virus. Still, sera of the former genotype triggered significantly greater ADCC than the latter (Figure 4), suggesting that the effect of G1m polymorphism on ADCC is, at least, partially independent of the vFcγR. In the same line, comparison of the fold ratios of CD107a⁺ NK cells induced by G1m3/3 or 17/17 sera in each experiment revealed no significant difference between the results obtained with the gE[−] (0.9–3.5) and the gE⁺ (1.2–2.9) HSV-1 strains (Figure 4).

Although our association studies showed that polymorphisms linked to CD32B or CD32C expression on NK-cell surface had no significant influence on susceptibility to HSV-1, those results do not exclude a possible influence on ADCC potency. Hence, we performed ADCC assays to compare individuals carrying the same CD16A-158 genotype, but different CD32B/CD32C genotypes and expression patterns (CD32B[−]/CD32C[−], CD32B⁺/CD32C[−] and CD32B[−]/CD32C⁺), as assessed by both DNA typing and flow cytometry. These assays revealed that NK-cell expression of CD32B or

CD32C did not significantly or consistently influence ADCC potency in our *in vitro* setting of HSV-1 infection (Figure 2).

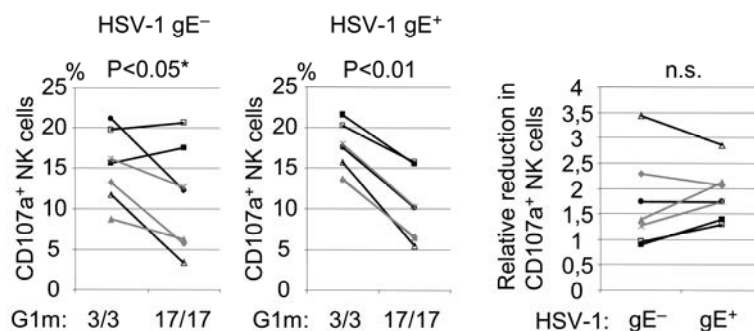


FIGURE 4. HSV-1 vFcyR contribution to NK-cell mediated ADCC, studied using mutant (gE⁻) or wild type (gE⁺) strains for the gE subunit of the decoy IgG receptor. Left and middle panels show percentages of CD107a⁺ cells induced by G1m3/3 serum, in comparison with G1m17/17 serum in paired ADCC experiments; right panel, fold reduction of CD107a⁺ cells in G1m17/17 serum is compared between paired experiments performed using gE⁻ and gE⁺ HSV-1 strains. Experiments were performed with PBMCs from four different individuals carrying a CD16A-158V/V genotype and three with a CD16A-158F/F one, tested against infected fibroblasts opsonized with sera from six paired donors, based on their IgG1 genotypes. The non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare NK-cell degranulation between subgroups. *A one-sided p-value was calculated to compare IgG1-allotype effect on NK-cell mediated ADCC against HSV-1 gE⁻ infected targets. In black, results from donors with CD16A-158V/V genotype, in grey, results from donors with CD16A-158F/F genotype.

Phenotype of NK cells exerting ADCC against HSV-1-infected targets

Mature CD56^{dim} NK cells can undergo clonal expansion and further differentiation, a process characterized by phenotypic and functional changes, which eventually generates memory-like, long-lived NK cells of unique phenotypes (38-42). Best known example of this is an NKG2C^{bright} memory-like NK-cell subset with a defined phenotype (NKG2A⁻KIR⁺, low Natural Cytotoxicity Receptor (NCR)-expression) that expands in many, but not all, healthy individuals infected with human cytomegalovirus (HCMV) (40, 42). Moreover, an overlapping memory-like, long-lived, mature CD57⁺NKG2A⁻NCR^{low} NK-cell subset, observed in HCMV-exposed individuals, frequently downregulates the common signaling adaptor gamma-chain of Fc receptors (FcRγ, also known as FcεR1γ); those cells have been proposed to be highly responsive to HCMV and HSV-1 infected cells in the presence of specific antibodies (43). To address whether and to which extent NK cells with memory-like phenotypes exert ADCC against HSV-1

infected fibroblasts, we measured degranulation of NK cells expressing or lacking particular differentiation markers in that setting. For these experiments, we selected previously immunophenotyped donors displaying measurable proportions of the aforementioned subpopulations. As in previous experiments, comparisons of ADCC activity were made after subtracting natural degranulation against infected targets (i.e. that seen in presence of serum lacking HSV-1-specific IgG).

Not surprisingly, ADCC was not restricted to a defined NK subset, but exerted by cells with diverse phenotypes. However, and in every individual, higher proportions of $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-$, as compared to $\text{NKG2C}^{\text{dim/-}}$, NK cells degranulated in ADCC against HSV-1-infected fibroblasts, and the same was true for CD57^+ vs. CD57^- NK cells (Figure 5A, both $p=0.031$); in contrast, the behavior of the $\text{Fc}\gamma\text{R}^-$ and $\text{Fc}\gamma\text{R}^+$ NK-cell subsets varied in different donors ($p=\text{n.s.}$). In line with these results, $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-\text{CD57}^+\text{Fc}\gamma\text{R}^-$ memory-like NK cells degranulated in all cases more than $\text{NKG2C}^{\text{dim/-}}\text{CD57}^+\text{Fc}\gamma\text{R}^-$ cells, and even than $\text{NKG2C}^{\text{bright}}$ cells with other $\text{CD57}/\text{Fc}\gamma\text{R}$ phenotypes (Figure 5B $p=0.031$). Taken together, our data indicate that ADCC in response to HSV-1 infected fibroblasts opsonised with human immune serum is exerted by NK cells of heterogeneous phenotypes, and it is enhanced in the highly differentiated $\text{NKG2C}^{\text{bright}}$ subset that expands in response to HCMV.

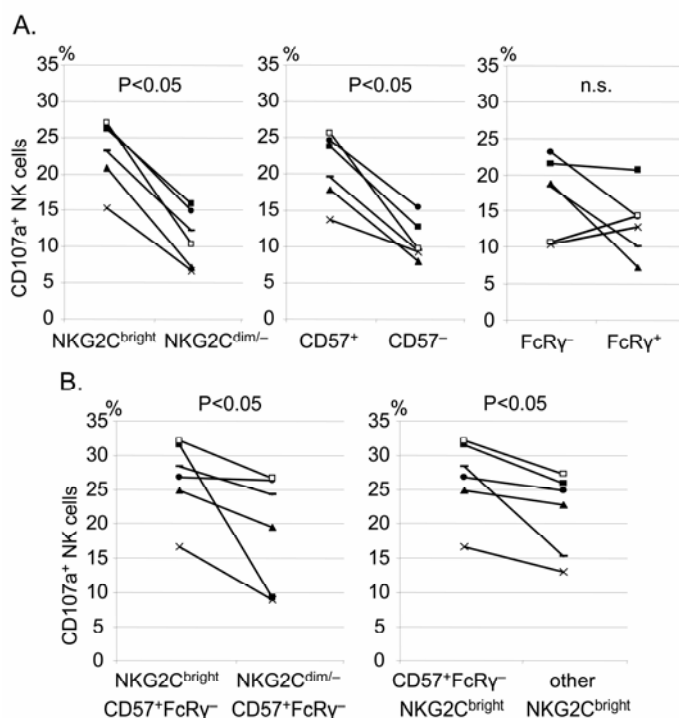


FIGURE 5. ADCC-induced degranulation exhibited by NK cells of different phenotypes, isolated from donors bearing an $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-$ NK-cell subset. A. Comparison of FcγR-negative vs positive (left), CD57 positive vs negative (middle), and $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-$ vs $\text{NKG2C}^{\text{dim/-}}$ (right) NK cells. B. Analysis of $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-\text{Fc}\gamma\text{R}^-\text{CD57}^+$ NK cells in comparison with $\text{Fc}\gamma\text{R}^-\text{CD57}^+$ cells not exhibiting an $\text{NKG2C}^{\text{bright}}$ phenotype (left); and with $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-$ ones with other $\text{Fc}\gamma\text{R}/\text{CD57}$ phenotypes

(right). Six different individuals with neatly identifiable expansions of $\text{NKG2C}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^-$ NK cells were tested. The non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare NK cell degranulation between different subgroups.

Discussion

Previous studies support the hypothesis that polygenic inheritance controls common variations in the clinical course of the HSV-1 infection (6). We reported that a series of polymorphic key regulators at the interface of innate and adaptive immunity (i.e. HLA class I molecules, KIR and CD16A) associate with this clinical variability, strengthening the essential role of cytotoxic lymphocytes in the immune control of HSV-1 (2). Polymorphisms of other genes, including *APOE* and *CSSG-1*, have also been related to susceptibility to recurrences, but their exact implication in HSV-1 control is as yet unknown (1, 44, 45). In turn, inborn mutations of TLR3-IFN signaling pathway genes predisposing to herpetic encephalitis support a crucial role for TLR3 in the control of HSV-1 primary infection in the central nervous system (3), but those mutations are apparently not connected with common forms of HSV-1 infection. In this study, we extend our previous findings, assessing the contribution of interaction between immunoglobulin and FcγR genetic polymorphisms to HSV-1 susceptibility.

Genetic variations in both FcγR and IgG heavy chain are attractive candidates to influence the immune responses against HSV-1, because they potentially modulate ADCC intensity, an important NK-cell effector mechanism. We previously showed that a CD16A-158V/V genotype confers protection from symptomatic herpes (2). Furthermore, major G1m allotypes in Caucasoids were recently pointed out as potential candidates to influence susceptibility to HSV-1, based on their different affinity-binding to HSV-1 gE/gI (7, 29), hence variable likeliness to be scavenged by the vFcγR decoy (28). The G1m1 allotype has actually been reported as a possible susceptibility factor for HSV-2 infection (46). According to our present results, G1m3/17 allotypes do not associate by themselves with the clinical course of HSV-1 infection, but they interact epistatically with a *FCGR3A* (CD16A) functional dimorphism, thus conditioning susceptibility to symptomatic HSV-1 recurrences. Specifically, the previously reported protective effect conferred by a CD16A-158V/V genotype (2) was enhanced in, or limited to, G1m3/3 individuals. Conversely, herpetic disease did not associate with Km1/3 allotypes (with or without stratification for CD16A genotype), and we detected interaction neither between G1m or Km allotypes, nor between them and CD32A-131H/R dimorphism, revealing a dominant effect of IgG1-CD16A interaction among the analyzed polymorphisms of immunoglobulins and their cellular receptors.

Notwithstanding the demonstrated effect of CD16A-158V/F polymorphism on IgG affinity, and vice versa, few studies have addressed functionally the influence of those polymorphisms on ADCC potency (47-49). In the current study, we observed a consistently enhanced NK-cell degranulation against opsonized, HSV-1-infected targets in CD16A-158V/V carriers compared to CD16A-158F/F ones. Similarly, G1m3/3

antibodies induced stronger NK-cell degranulation in this context, as compared to G1m17/17 ones, despite our observation that G1m allotypes appear not to associate on their own with HSV-1 immunity. The combined genotype CD16A-158V/V+G1m3/3 was hence associated with the most potent NK-cell mediated ADCC, as compared to any other combination of CD16A+IgG1 genotypes. We thus expand knowledge on FcγR-IgG interaction and provide further evidence on the implication of *IGHG* polymorphism in NK-cell response by demonstrating that CD16A-158V/F and G1m allotypes condition ADCC intensity against HSV-1 infected cells.

The strength of Fc receptor-antibody interaction has previously been shown to condition NK-cell activation and ADCC potency (47, 50). In an infection setting, HSV-1 vFcγR has been proposed to hamper ADCC efficacy (8, 51), therefore a higher affinity host FcγR could better compete with the vFcγR decoy and compensate this subversion mechanism. Indeed, the estimated K_d for vFcγR-G1m17,1 binding is similar to the K_d of the CD16A-158F-IgG1 interaction (7, 29, 47, 52). Thus, lower-affinity G1m3-vFcγR, together with a higher-affinity G1m3-CD16A-158V/V, interactions could suffice to counteract the viral immune evasion mechanism, explaining all our functional and clinical observations. However, we observed that antibodies of the G1m3 allotype induced stronger NK-cell degranulation even against targets infected with a HSV-1 strain lacking vFcγR. This reveals a direct effect of G1m polymorphism on ADCC intensity, independent of the virus subversion mechanism, and possibly mediated by the affinity binding of CD16A to different IgG1 allotypes.

Even though our *in vitro* setting might not accurately mirror the overall response to HSV-1 *in vivo*, murine models showed that human anti-HSV-1 antibodies confer significant protection to subsequent HSV-1 infection, irrespective of the vFcγR⁺ (53-56). Likewise, our findings point to a limited capacity of vFcγR to subvert FcγR-driven NK-cell activation and they are consistent with previous reports indicating that G1m polymorphism also affects IgG1-CD16A binding itself. IgG1 allotype G1m17 differs from G1m3 at position 214 (CH1, arginine for lysine), and it associates almost invariably in Caucasoids with another two substitutions (Glu356Asp and Met358Leu, CH3), that determine the G1m1 allotype (35, 36, 57). Site-directed mutagenesis assays demonstrated the importance of IgG1 heavy-chain residue 214 (and to a lesser extent 356 and 358) for HSV-1 FcγR binding (7, 29), but none of these interacts directly with human FcγR (19, 50). Yet, these substitutions might allosterically influence IgG1 avidity for cellular FcγR. Supporting this hypothesis are affinity-binding assays showing higher affinity of G1m3, as compared to G1m17,1, for both CD16A-158V and -158F (29). Likewise, ADCC competition assays showed that IgG aggregates carrying the G1m17,1 allotype (nb – but not the G1m3 one) bind with lower affinity to CD16A-

158F/F than to 158V/V NK cells (58). All those results, like ours, point collectively to a G1m3 allotype directly enhancing ADCC regardless of presence or absence of a pathogen FcγR.

The inhibitory receptor CD32B, classically considered to be expressed only on B lymphocytes or myeloid cells, and the activating CD32C, generally not expressed, can both be detected on the NK cells of some individuals, and their expression on this lymphocyte subset has been reported to modulate ADCC potency in some, but not all, assays (15, 16, 59, 60). In our *in-vitro* setting of HSV-1 infection, significant CD32B and CD32C contributions to NK-cell mediated ADCC were undetectable. Among FcγRs, CD32B and CD32C bind to IgG1 with lowest affinity (52, 61), and the CD32C staining pattern in flow cytometry is consistent with low expression on NK cells (Suppl. figure), therefore, inefficient competition of CD32B/C with CD16A could explain the latter FcγR dominating the overall NK cell mediated ADCC. In addition, lower-affinity CD32B/C binding to IgG could be more efficiently competed by vFcγR than that of CD16A. More precise assessment of the CD32C⁺/CD32B⁺ NK-cell role in immunity falls outside the purpose of this work, therefore we can not exclude a marginal contribution of these receptors to antibody-dependent, cytotoxic or non-cytotoxic NK-cell responses to HSV-1. Nevertheless, against a major role for NK-cell expression of CD32B and CD32C in immune response to HSV-1 also stands our association study showing that genetic variations controlling such expression do not significantly influence the clinical course of the infection.

A recent study showed increased antibody-driven IFN-γ production for FcRγ⁻ NK cells, in response to both HSV-1 and HCMV infected cells (43). Likewise, enhanced degranulation and IFN-γ production in response to HIV⁺ ADCC targets was observed for differentiated, CD57⁺/KIR3DL1⁺ NK cells (62, 63). Furthermore, a major role in cytokine production and specific degranulation triggered by opsonized HCMV-infected targets has been established for NKG2C^{bright} NK cells that expand in response to the latter virus, many of which express CD57 and downregulate FcRγ as memory-like differentiation markers (64, 65). Of note, NKG2C^{bright}-cell expansions are specifically triggered, through unknown mechanisms, by HCMV, but not by HSV-1 or other human viruses (40, 41). In our *in vitro* setting of NK-cell response to opsonized, HSV-1 infected targets, phenotype analysis showed that HSV-1 can readily trigger ADCC in NK cells of different phenotypes and maturation stages. Nonetheless, an enhanced capacity to degranulate in antibody-mediated cytotoxic response was seen among NKG2C^{bright}NKG2A⁻ and CD57⁺ NK cells, and, in particular, among those with the combined NKG2C^{bright}NKG2A⁻FcRγ⁻CD57⁺ phenotype. These data, in line with those obtained with HCMV, underline a phenotypic variable that seems to modify efficacy of

the NK-cell response. Since these phenotypic traits are in part determined by environment (i.e. HCMV infection), and current genetic tests cannot predict them, further specific studies are warranted to determine whether, how, and to what extent an expanded NKG2C^{bright}NKG2A⁻FcRγ⁻CD57⁺ NK subset might modify immunity to HSV-1.

In summary, our results show that both CD16A-158V and G1m3 allotypes enhance NK cell-mediated cytotoxicity against HSV-1 infected, opsonized targets, and that those polymorphisms interact epistatically, protecting from clinical HSV-1 recurrence. This underlines NK-cell mediated ADCC as an important anti-viral mechanism controlling HSV-1 reactivation, and combined *FCGR3A* (CD16A) and *IGHG1* (IgG1) genetic variability as a key contributor to susceptibility to infection.

Acknowledgments

We thank Drs. S. Efstathiou and H. Browne (Department of Pathology, University of Cambridge) for the gifts of viruses and cell lines, Dr. Elvira Ramil and Dr. Aránzazu García Grande, from the DNA sequencing and Flow cytometry facilities of Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, for expert support, and all of the individuals who kindly donated blood samples. This work was supported by *Ministerio de Economía y Competitividad* grants BFU2005-04622 (to C.V.), SAF2010–22153-C03 (to M.L.-B. and C.V.), *Fundació La Marató TV3* (grant 121531 to M.L.-B. and C.V.) and Fondo de Investigación Sanitaria PI11/00298 (to HTR). M.M. was supported, successively, by SAF2010–22153-C03 and Fundació La Marató TV3 grant 121531, and AM was supported by AECC Foundation.

References

1. Hobbs, M. R., B. B. Jones, B. E. Otterud, M. Leppert, and J. D. Kriesel. 2008. Identification of a herpes simplex labialis susceptibility region on human chromosome 21. *J Infect Dis*. **197**: 340-346.
2. Moraru, M., E. Cisneros, N. Gomez-Lozano, R. de Pablo, F. Portero, M. Canizares, M. Vaquero, G. Roustán, I. Millán, M. Lopez-Botet, and C. Vilches. 2012. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol* **188**: 4412-4420.
3. Zhang, S. Y., L. Abel, and J. L. Casanova. 2013. Mendelian predisposition to herpes simplex encephalitis. *Handb Clin Neurol* **112**: 1091-1097.
4. Lanier, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. **23**: 225-274.
5. Mathiesen, T., M. A. Persson, V. A. Sundqvist, and B. Wahren. 1988. Neutralization capacity and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity of separated IgG subclasses 1, 3 and 4 against herpes simplex virus. *Clin Exp Immunol*. **72**: 211-215.
6. Moraru, M., and C. Vilches. 2015. Host genetics and response to Herpes simplex type I infection. In *Genomics, personalized medicine and oral disease*. S. Sonis, ed. Springer Publisher, p. in press.
7. Atherton, A., K. L. Armour, S. Bell, A. C. Minson, and M. R. Clark. 2000. The herpes simplex virus type 1 Fc receptor discriminates between IgG1 allotypes. *Eur J Immunol*. **30**: 2540-2547.
8. Dubin, G., E. Socolof, I. Frank, and H. M. Friedman. 1991. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol*. **65**: 7046-7050.
9. Frank, I., and H. M. Friedman. 1989. A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J Virol*. **63**: 4479-4488.
10. Johansson, P. J., T. Hallberg, V. A. Oxelius, A. Grubb, and J. Blomberg. 1984. Human immunoglobulin class and subclass specificity of Fc receptors induced by herpes simplex virus type 1. *J Virol*. **50**: 796-804.
11. Johnson, D. C., M. C. Frame, M. W. Ligas, A. M. Cross, and N. D. Stow. 1988. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J Virol* **62**: 1347-1354.
12. Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* **8**: 34-47.
13. Breunis, W. B., E. van Mirre, J. Geissler, N. Laddach, G. Wolbink, E. van der Schoot, M. de Haas, M. de Boer, D. Roos, and T. W. Kuijpers. 2009. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat*. **30**: E640-650.
14. van Sorge, N. M., W. L. van der Pol, and J. G. van de Winkel. 2003. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*. **61**: 189-202.
15. van der Heijden, J., W. B. Breunis, J. Geissler, M. de Boer, T. K. van den Berg, and T. W. Kuijpers. 2012. Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J Immunol* **188**: 1318-1324.
16. Metes, D., L. K. Ernst, W. H. Chambers, A. Sulica, R. B. Herberman, and P. A. Morel. 1998. Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcγRIIC gene. *Blood*. **91**: 2369-2380.
17. Mueller, M., P. Barros, A. S. Witherden, A. L. Roberts, Z. Zhang, H. Schaschl, C. Y. Yu, M. E. Hurler, C. Schaffner, R. A. Floto, L. Game, K. M. Steinberg, R. K. Wilson, T. A. Graves, E. E. Eichler, H. T. Cook, T. J. Vyse, and T. J. Aitman. 2013. Genomic pathology of SLE-associated copy-number variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2B locus. *Am J Hum Genet* **92**: 28-40.
18. Wu, J., J. C. Edberg, P. B. Redecha, V. Bansal, P. M. Guyre, K. Coleman, J. E. Salmon, and R. P. Kimberly. 1997. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. **100**: 1059-1070.
19. Sondermann, P., R. Huber, V. Oosthuizen, and U. Jacob. 2000. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γRIII complex. *Nature*. **406**: 267-273.

20. Radaev, S., S. Motyka, W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman, and P. D. Sun. 2001. The structure of a human type III Fcgamma receptor in complex with Fc. *J Biol Chem.* **276**: 16469-16477.
21. Breunis, W. B., E. van Mirre, M. Bruin, J. Geissler, M. de Boer, M. Peters, D. Roos, M. de Haas, H. R. Koene, and T. W. Kuijpers. 2008. Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* **111**: 1029-1038.
22. Aitman, T. J., R. Dong, T. J. Vyse, P. J. Norsworthy, M. D. Johnson, J. Smith, J. Mangion, C. Robertson-Lowe, A. J. Marshall, E. Petretto, M. D. Hodges, G. Bhangal, S. G. Patel, K. Sheehan-Rooney, M. Duda, P. R. Cook, D. J. Evans, J. Domin, J. Flint, J. J. Boyle, C. D. Pusey, and H. T. Cook. 2006. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature.* **439**: 851-855.
23. Fanciulli, M., P. J. Norsworthy, E. Petretto, R. Dong, L. Harper, L. Kamesh, J. M. Heward, S. C. Gough, A. de Smith, A. I. Blakemore, P. Froguel, C. J. Owen, S. H. Pearce, L. Teixeira, L. Guillevin, D. S. Graham, C. D. Pusey, H. T. Cook, T. J. Vyse, and T. J. Aitman. 2007. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet.* **39**: 721-723.
24. Pandey, J. P., and Z. Li. 2013. The forgotten tale of immunoglobulin allotypes in cancer risk and treatment. *Exp Hematol Oncol* **2**: 2162-3619.
25. Oxelius, V. A., and J. P. Pandey. 2013. Human immunoglobulin constant heavy G chain (IGHG) (Fcgamma) (GM) genes, defining innate variants of IgG molecules and B cells, have impact on disease and therapy. *Clin Immunol* **149**: 475-486.
26. Pandey, J. P. 2000. Immunoglobulin GM and KM allotypes and vaccine immunity. *Vaccine.* **19**: 613-617.
27. Lefranc, M. P., and G. Lefranc. 2012. Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. *Methods Mol Biol* **882**: 635-680.
28. Pandey, J. P. 2012. Immunoglobulin genes and immunity to herpes simplex virus type 1. *J Infect Dis* **206**: 143-144.
29. Armour, K. L., C. S. Smith, and M. R. Clark. 2010. Expression of human FcgammaRIIIa as a GPI-linked molecule on CHO cells to enable measurement of human IgG binding. *J Immunol Methods* **354**: 20-33.
30. Moxley, G., and R. S. Gibbs. 1992. Polymerase chain reaction-based genotyping for allotypic markers of immunoglobulin kappa shows allelic association of Km with kappa variable segment. *Genomics.* **13**: 104-108.
31. Vilches, C., J. Castano, P. Munoz, and J. Penalver. 2008. Simple genotyping of functional polymorphisms of the human immunoglobulin G receptors CD16A and CD32A: a reference cell panel. *Tissue Antigens.* **71**: 242-246.
32. Chisholm, S. E., K. Howard, M. V. Gomez, and H. T. Reyburn. 2007. Expression of ICP0 is sufficient to trigger natural killer cell recognition of herpes simplex virus-infected cells by natural cytotoxicity receptors. *J Infect Dis.* **195**: 1160-1168.
33. Balan, P., N. Davis-Poynter, S. Bell, H. Atkinson, H. Browne, and T. Minson. 1994. An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J Gen Virol.* **75**: 1245-1258.
34. Showalter, S. D., M. Zweig, and B. Hampar. 1981. Monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1 proteins, including the immediate-early protein ICP 4. *Infect Immun.* **34**: 684-692.
35. Schanfield, M. S., P. Herzog, and H. H. Fudenberg. 1975. Immunoglobulin allotypes of European populations. II. Gm, Am and Km(Inv) allotypic markers in Czechoslovakians. *Hum Hered.* **25**: 382-392.
36. Schanfield, M. S., J. Gergely, and H. H. Fudenberg. 1975. Immunoglobulin Allotypes of European Populations. I. Gm and Km(Inv) allotypic markers in Hungarians. *Hum Hered.* **25**: 370-377.
37. Lejeune, J., B. Piegu, V. Gouilleux-Gruart, M. Ohresser, H. Watier, and G. Thibault. 2012. FCGR2C genotyping by pyrosequencing reveals linkage disequilibrium with FCGR3A V158F and FCGR2A H131R polymorphisms in a Caucasian population. *MAbs.* **4**: 784-787.
38. Beziat, V., B. Descours, C. Parizot, P. Debre, and V. Vieillard. 2010. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* **5**: 0011966.

39. Bjorkstrom, N. K., P. Riese, F. Heuts, S. Andersson, C. Fauriat, M. A. Ivarsson, A. T. Bjorklund, M. Flodstrom-Tullberg, J. Michaelsson, M. E. Rottenberg, C. A. Guzman, H. G. Ljunggren, and K. J. Malmberg. 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **116**: 3853-3864.
40. Guma, M., A. Angulo, C. Vilches, N. Gomez-Lozano, N. Malats, and M. Lopez-Botet. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* **104**: 3664-3671.
41. Lopez-Botet, M., A. Muntasell, and C. Vilches. 2014. The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol* **26**: 145-151.
42. Muntasell, A., M. Lopez-Montanes, A. Vera, G. Heredia, N. Romo, J. Penafiel, M. Moraru, J. Vila, C. Vilches, and M. Lopez-Botet. 2013. NKG2C zygosity influences CD94/NKG2C receptor function and the NK-cell compartment redistribution in response to human cytomegalovirus. *Eur J Immunol* **43**: 3268-3278.
43. Zhang, T., J. M. Scott, I. Hwang, and S. Kim. 2013. Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcRgamma deficiency. *J Immunol* **190**: 1402-1406.
44. Kriesel, J. D., B. B. Jones, N. Matsunami, M. K. Patel, C. A. St Pierre, E. A. Kurt-Jones, R. W. Finberg, M. Leppert, and M. R. Hobbs. 2011. C21orf91 genotypes correlate with herpes simplex labialis (cold sore) frequency: description of a cold sore susceptibility gene. *J Infect Dis* **204**: 1654-1662.
45. Itzhaki, R., and M. Wozniak. 2008. Susceptibility to herpes simplex labialis conferred by the gene encoding apolipoprotein E. *J Infect Dis* **198**: 624-625; author reply 625-626.
46. Seppanen, M., S. Meri, I. L. Notkola, I. J. Seppala, E. Hiltunen-Back, H. Sarvas, M. Lappalainen, H. Valimaa, A. Palikhe, V. V. Valtonen, and M. L. Lokki. 2006. Subtly impaired humoral immunity predisposes to frequently recurring genital herpes simplex virus type 2 infection and herpetic neuralgia. *J Infect Dis* **194**: 571-578.
47. Vance, B. A., T. W. Huizinga, K. Wardwell, and P. M. Guyre. 1993. Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of Fc gamma RIII on large granular lymphocyte/natural killer cells. *J Immunol* **151**: 6429-6439.
48. Varchetta, S., N. Gibelli, B. Oliviero, E. Nardini, R. Gennari, G. Gatti, L. S. Silva, L. Villani, E. Tagliabue, S. Menard, A. Costa, and F. F. Fagnoni. 2007. Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Res* **67**: 11991-11999.
49. Hatjiharissi, E., L. Xu, D. D. Santos, Z. R. Hunter, B. T. Ciccarelli, S. Verselis, M. Modica, Y. Cao, R. J. Manning, X. Leleu, E. A. Dimmock, A. Kortsaris, C. Mitsiades, K. C. Anderson, E. A. Fox, and S. P. Treon. 2007. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* **110**: 2561-2564.
50. Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox, and L. G. Presta. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* **276**: 6591-6604.
51. Corrales-Aguilar, E., M. Trilling, K. Hunold, M. Fiedler, V. T. Le, H. Reinhard, K. Ehrhardt, E. Merce-Maldonado, E. Aliyev, A. Zimmermann, D. C. Johnson, and H. Hengel. 2014. Human cytomegalovirus Fcgamma binding proteins gp34 and gp68 antagonize Fcgamma receptors I, II and III. *PLoS Pathog* **10**: e1004131. doi:1004110.1001371/journal.ppat.1004131.
52. Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daeron. 2009. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**: 3716-3725.
53. Erlich, K. S., and J. Mills. 1986. Passive immunotherapy for encephalitis caused by herpes simplex virus. *Rev Infect Dis* **8 Suppl 4**: S439-445.
54. LeBlanc, R. A., L. Pesnicak, M. Godleski, and S. E. Straus. 1999. Treatment of HSV-1 infection with immunoglobulin or acyclovir: comparison of their effects on viral spread, latency, and reactivation. *Virology* **262**: 230-236.

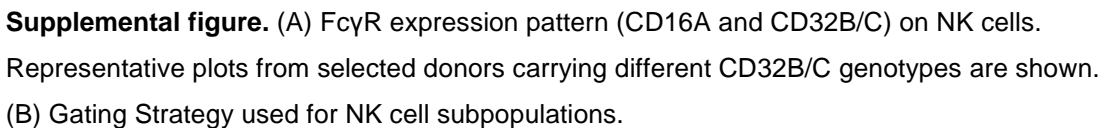
55. Dalai, S. K., L. Pesnicak, G. F. Miller, and S. E. Straus. 2002. Prophylactic and therapeutic effects of human immunoglobulin on the pathobiology of HSV-1 infection, latency, and reactivation in mice. *J Neurovirol.* **8**: 35-44.
56. Sanna, P. P., A. De Logu, R. A. Williamson, Y. L. Hom, S. E. Straus, F. E. Bloom, and D. R. Burton. 1996. Protection of nude mice by passive immunization with a type-common human recombinant monoclonal antibody against HSV. *Virology.* **215**: 101-106.
57. Mayr, W. R., and D. Mickerts. 1970. [Human gamma globulin polymorphism. Calculation of its distribution in Vienna and its suitability in paternity cases]. *Acta Biol Med Ger.* **25**: 473-482.
58. Namboodiri, A. M., and J. P. Pandey. 2011. Differential inhibition of trastuzumab- and cetuximab-induced cytotoxicity of cancer cells by immunoglobulin G1 expressing different GM allotypes. *Clin Exp Immunol* **166**: 361-365.
59. Dutertre, C. A., E. Bonnin-Gelize, K. Pulford, D. Bourel, W. H. Fridman, and J. L. Teillaud. 2008. A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory FcγRIIB modulating antibody-dependent function. *J Leukoc Biol.* **84**: 1511-1520.
60. Ernst, L. K., D. Metes, R. B. Herberman, and P. A. Morel. 2002. Allelic polymorphisms in the FcγRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med (Berl).* **80**: 248-257.
61. Maenaka, K., P. A. van der Merwe, D. I. Stuart, E. Y. Jones, and P. Sonderrmann. 2001. The human low affinity Fcγ receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem.* **276**: 44898-44904.
62. Parsons, M. S., L. Wren, G. Isitman, M. Navis, I. Stratov, N. F. Bernard, and S. J. Kent. 2012. HIV infection abrogates the functional advantage of natural killer cells educated through KIR3DL1/HLA-Bw4 interactions to mediate anti-HIV antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol* **86**: 4488-4495.
63. Parsons, M. S., L. Loh, S. Gooneratne, R. J. Center, and S. J. Kent. 2014. Role of education and differentiation in determining the potential of natural killer cells to respond to antibody-dependent stimulation. *AIDS* **28**: 2781-2786.
64. Wu, Z., C. Sinzger, G. Frascaroli, J. Reichel, C. Bayer, L. Wang, R. Schirmbeck, and T. Mertens. 2013. Human cytomegalovirus-induced NKG2C(hi) CD57(hi) natural killer cells are effectors dependent on humoral antiviral immunity. *J Virol* **87**: 7717-7725.
65. Costa-Garcia, M., A. Vera, M. Moraru, C. Vilches, M. Lopez-Botet, and A. Muntasell. 2015. Antibody-Mediated Response of NKG2Cbright NK Cells against Human Cytomegalovirus. *J Immunol* **194**: 2715-2724.

Abbreviations used in this article: ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity; Fcγ, FcεRI gamma-chain; FCGR, FcγR locus; gE, glycoprotein E; gI, glycoprotein I; gH, glycoprotein I; Gm, gamma heavy chain allotypes; HCMV, human cytomegalovirus; hTERT, Human telomerase reverse transcriptase-immortalization; IGHG, gamma heavy chain locus; Km, kappa light chain allotypes; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; NCR, Natural Cytotoxicity Receptors; vFcyR, viral (HSV-1) receptor for the crystallizable fraction of immunoglobulins.

Supplemental table I. **G1m, Km, CD32B^{NK}, CD32C and combined genotype frequencies.**

Genotype	Seronegatives N=65, n (%)	Seropositives (all) N=226, n (%)	Seropositives (asymptomatics) N=68, n (%)	Seropositives (symptomatics) N=158, n (%)	<i>P</i> -value (asymptomatics vs. symptomatics)
<i>G1m3/3</i>	34 (52.3)	119 (52.7)	38 (55.9)	81 (51.3)	n.s.
<i>G1m3/17</i>	26 (40.0)	91 (40.3)	26(38.2)	65 (41.1)	n.s.
<i>G1m17/17</i>	5 (7.7)	16 (7.1)	4 (5.9)	12 (7.6)	n.s.
<i>Km3/3</i>	48 (73.9)	187 (82.7)	58 (85.3)	129 (81.7)	n.s.
<i>Km1/3</i>	16 (24.6)	36 (15.9)	9 (13.2)	27 (17.1)	n.s.
<i>Km1/1</i>	1 (1.5)	3 (1.3)	1 (1.5)	2 (1.3)	n.s.
<i>G1m3/3 + Km3/3</i>	26 (40.0)	98 (43.4)	32 (47.1)	66 (41.8)	n.s.
<i>CD16A-158V/V</i> + <i>G1m3/3</i>	5 (7.7)	15 (6.6)	10 (14.7)	5 (3.2)	0.005
<i>CD16A-158V/V</i> + <i>Km3/3</i>	7 (10.8)	24 (10.6)	11 (16.2)	13 (8.2)	n.s.
<i>CD32A-131H/H</i> + <i>G1m3/3</i>	7 (10.8)	22 (9.7)	4 (5.9)	18 (11.4)	n.s.
<i>CD32A-131H/H</i> + <i>Km3/3</i>	8 (12.3)	38 (16.8)	9 (13.2)	29 (18.3)	n.s.
<i>CD32B^{NK/NK}</i>	n.d.	1(0.4)	0 (0)	1 (0.6)	n.s.
<i>CD32B^{NK/WT}</i>	n.d.	25 (11.1)	9 (13.2)	16 (10.1)	n.s.
<i>CD32B^{WT/WT}</i>	n.d.	200 (88.5)	59 (86.8)	141 (89.2)	n.s.
<i>CD32C^{ORF/ORF}</i>	n.d.	3 (1.3)	0 (0)	3 (1.9)	n.s.
<i>CD32C^{ORF/-}</i>	n.d.	43 (19.0)	13 (19.1)	30 (19.0)	n.s.
<i>CD32C^{-/-}</i>	n.d.	180 (72.1)	55 (80.9)	125 (79.1)	n.s.
<i>CD32C-13^{Gln/Gln}</i>	n.d.	7 (3.1)	0 (0)	7 (4.4)	n.s.
<i>CD32C-13^{Gln/TAG}</i>	n.d.	56 (24.8)	18 (26.5)	38 (24.1)	n.s.
<i>CD32C-13^{TAG/TAG}</i>	n.d.	163 (72.1)	50 (73.5)	113 (71.5)	n.s.

N.d., not determined; n.s. not significant. Seronegative and seropositive individuals did not differ significantly at any of the studied markers.



El curso clínico de muchas infecciones virales en humanos es altamente variable y a esta variabilidad contribuye, entre otros factores, la diversidad genética del hospedador. En un contexto amplio, el resultado de la interacción patógeno-hospedador se traduce en susceptibilidad o resistencia a la infección. Clásicamente, se consideraba que la susceptibilidad genética a la infección puede agruparse en dos categorías: (i) la predisposición a infecciones múltiples determinada por mutaciones de herencia mendeliana en genes únicos, que corresponde a la definición tradicional de una inmunodeficiencia primaria, o (ii) la susceptibilidad a la infección por un único patógeno común, que suele ser el resultado de la presencia de una serie de polimorfismos en genes múltiples. Sin embargo, con la caracterización de nuevas inmunodeficiencias primarias no convencionales a lo largo de los últimos años, ha surgido una tercera categoría (iii) en la que defectos genéticos en genes únicos confieren susceptibilidad a infecciones por un solo patógeno (Casanova y Abel, 2007). Notablemente, la susceptibilidad a la infección por HSV-1, en sus diferentes formas, puede incluirse en las tres categorías; y es que esta tercera categoría de predisposición genética a la infección ha surgido precisamente a partir de la caracterización de defectos genéticos que predisponen al desarrollo de la encefalitis herpética (Casanova y Abel, 2007). En cuanto a la primera categoría, varios tipos de inmunodeficiencias primarias, sobre todo las que afectan al número o a la funcionalidad de las células NK, o a la activación de la respuesta de interferones, cursan con infecciones herpéticas recurrentes, algunas de ellas de gran transcendencia clínica (Jouanguy et al, 2013; Orange 2013; Sancho-Shimizu et al, 2011b; Bustamente et al, 2008). Mientras que los diferentes tipos de susceptibilidad a la infección determinados por mutaciones patogénicas (i y iii) están restringidos a un número muy limitado de pacientes inmunodeficientes, hay evidencias que apoyan una herencia poligénica como responsable de la resistencia a sufrir infecciones recurrentes de herpes labial en la población inmunocompetente (Moraru y Vilches, 2015). Esta segunda categoría (ii) refleja el objetivo global de esta tesis. Para alcanzarlo, analizamos la contribución de la diversidad inmunogenética del hospedador a la susceptibilidad de sufrir infecciones recurrentes por el HSV-1, e identificamos varios genes polimórficos en la interfaz de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, relacionados principalmente con la activación de linfocitos citotóxicos, que condicionan la variabilidad de la respuesta clínica a la infección.

1. La influencia del polimorfismo genético del sistema HLA

El polimorfismo extremo del complejo MHC humano y su probable condicionamiento por presiones selectivas, sobre todo en relación con la presencia de diferentes patógenos, lo sitúa entre los candidatos punteros para influir en el curso clínico de la infección por HSV-1. Además, las moléculas HLA tienen un papel clave en la presentación antigénica y en la modulación de la activación de las células NK. Eso implica su control directo sobre la actividad de los linfocitos citotóxicos, que, como se ha reseñado previamente, son los efectores celulares de mayor relevancia para la defensa frente a las infecciones virales. Por tanto, no es sorprendente que durante los años 70 y 80 se llevaran a cabo varios estudios que trataron de establecer asociaciones significativas entre los distintos alelos HLA y el curso clínico de la infección herpética (revisado en Moraru et al, 2012a). En años posteriores se realizaron además importantes avances en la metodología para el estudio del polimorfismo HLA, ampliando enormemente el número de alelos HLA conocidos.

Por todo ello y considerando la escasa reproducibilidad de los resultados previos, eran necesarios nuevos estudios de asociación que aclarasen el papel del polimorfismo genético del locus HLA en la susceptibilidad a HSV-1. En nuestro estudio HLA-B*18 se perfila como factor protector y HLA-C*15 como factor de riesgo de sufrir enfermedad herpética recurrente (Moraru et al, 2012a). Encontramos también una tendencia a que HLA-B*35 confiera protección frente a las recurrencias de la infección, en concordancia con los resultados publicados previamente en una serie de individuos de origen siciliano (Gallina et al, 1987). De manera similar, algunos de los alelos HLA-A que codifican el alotipo A19, al que nuestro análisis de regresión múltiple identifica como factor riesgo para una infección recurrente, han sido también relacionados previamente con el curso clínico de la infección (Russell y Schlaut, 1977; Zimmerman et al, 1977).

En conjunto, los datos publicados hasta ahora indican que la presencia de diferentes alelos HLA de clase I se correlaciona con el curso clínico de la infección por HSV-1, mientras que el polimorfismo en los genes que codifican moléculas HLA de clase II no parece estar relacionado con ello. Este efecto predominante de las moléculas HLA de clase I podría explicarse por su papel en la presentación antigénica a los linfocitos T CD8+ o en la modulación de la activación de las células NK, siendo ambos subtipos linfocitarios clave en el control de las infecciones virales. De los alelos HLA de clase I que contribuyen al curso clínico de la infección herpética identificados en nuestro estudio, solo HLA-C*15 es ligando conocido para receptores de células NK. En el

apartado siguiente se discuten las implicaciones de la expresión conjunta de receptores KIR y sus ligandos HLA-C.

Para activarse, los linfocitos T CD8⁺ requieren la presentación de péptidos antigénicos en complejo con moléculas HLA de clase I, aunque solo una pequeña fracción de los péptidos que podrían generarse a partir de las diferentes proteínas puede activar a estos linfocitos. Esta inmunodominancia de ciertos péptidos guarda relación con una serie de factores como los niveles de expresión génica, la capacidad del proteasoma de degradar estas proteínas, la eficiencia del TAP para transportar los péptidos resultantes al retículo endoplásmico, la probabilidad de unión de estos péptidos a las moléculas HLA de clase I de cada individuo, la afinidad del TCR para estos complejos HLA-péptido, la frecuencia de los precursores T específicos y su capacidad para expandirse y sobrevivir (St Leger y Hendricks, 2011b). Efectivamente, en la infección por HSV-1 se ha observado que la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ está restringida a un repertorio de péptidos bastante limitado y, al igual que en el caso del hCMV, la mayoría de ellos proceden de proteínas virales producidas antes del inicio de la replicación del ADN viral (Koelle et al, 2003; Reddehase et al, 1987).

En la infección experimental del ratón, más de un 50% de los linfocitos T CD8⁺ que infiltran los ganglios trigeminales reconocen un solo péptido derivado de la gB, una proteína viral codificada por un gen $\gamma 1$, limitandose la especificidad del resto a otros pocos epítomos subdominantes derivados de solo 10 proteínas virales (St. Leger et al, 2011a; Wallace et al, 1999; Khana et al, 2003). Se desconoce si esta situación es extrapolable a la infección en humanos. Sin embargo, las vacunas anti-HSV generadas a partir de péptidos o proteínas truncadas derivadas de gB (y gD) no confieren protección a largo plazo (Corey et al, 1999; Straus et al, 1997). Los datos disponibles de estudios de predicción de epítomos inmunogénicos en humanos indican que, si bien el repertorio de péptidos derivados de HSV-1 que son reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ está muy restringido en cada individuo, hay una importante heterogeneidad interindividual (Mikloska et al, 2000; Derville et al, 2013; Srivastava et al, 2015; van Veltzen et al, 2013).

Nuestros estudios de predicción de la presentación de péptidos de origen viral por las moléculas HLA de clase I que confieren riesgo o susceptibilidad al HSV-1 indican que el producto de los alelos (de protección) HLA-B*18:01 y HLA-B*35 más comunes (HLA-B*35:01, *35:02, *35:03 y *35:08) presentan un único péptido derivado del dominio RING *finger* de la ICP0 (requerido para todas sus actividades biológicas (Everett 2000)), mientras que las moléculas codificadas por HLA-C*15 (de riesgo para la infección) no se estima que puedan presentar péptidos derivados de este fragmento

proteico (Moraru et al, 2012a). La ICP0 es una proteína viral multifuncional codificada por un gen *IE* que regula la estabilidad de varias proteínas intracelulares, las respuestas al daño del ADN o la producción de IFN (Boutell y Everett 2013). Tiene un papel clave en el mantenimiento del equilibrio entre el estado latente y las reactivaciones del HSV-1 y existen indicios de que su ausencia permite el silenciamiento de la transcripción viral por mecanismos celulares todavía desconocidos (Preston, 2000; Everett, 2000). Además, su unión a USP7, una proteína de la familia de las proteasas específicas de la ubiquitina, impediría la degradación de proteínas en el proteasoma, por lo que podría limitar también la presentación antigénica de péptidos virales (Everett et al, 1997).

La detección de transcritos de ICP0 en los ganglios sensitivos infectados, que se correlaciona con la expansión clonal y la acumulación de linfocitos T CD8+ activados en estos ganglios, apoya un modelo en el que ICP0 se expresa durante el estado latente (Derfuss et al, 2007). Su degradación temprana favorecería el mantenimiento del estado latente. Nuestros resultados indican que la susceptibilidad a sufrir recurrencias podría estar relacionada, en parte, con la capacidad de las moléculas HLA de clase I para presentar péptidos derivados de esta proteína viral (Moraru et al, 2012a). Si bien otro estudio más reciente ha identificado también un péptido inmunodominante derivado de ICP0 (van Veltzen et al, 2013) y pese a las ventajas que ofrecería el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas que se expresan antes o incluso en ausencia de la replicación viral, se requieren más estudios para confirmar esta relación causal.

Varios estudios indican que la generación del repertorio de péptidos antigénicos no es fácilmente predecible en el contexto de una infección viral. Clásicamente se consideraba que los péptidos presentados por moléculas HLA de clase I provienen de la degradación de proteínas maduras, pero datos más recientes indican que una fracción de estos péptidos podría derivar de productos génicos defectuosos conocidos como DRiPs (*defective ribosomal products*) (Bourdetsky et al; 2014; Yewdell y Nicchitta, 2006). La generación de los DRiPs podría estar aumentada en células infectadas, siendo el origen de estas proteínas defectuosas el propio genoma viral o la alteración de la síntesis de proteínas endógenas debida a la infección. A favor de la presentación preferente de péptidos derivados de DRiPs está la rapidez del procesamiento antigénico de las proteínas virales (que puede llegar a requerir una sola hora, aunque su vida media es de varios días) y la observación de que los epítomos virales para linfocitos T CD8+ se generan principalmente a partir de proteínas recién sintetizadas (Khan et al, 2001; Yewdell y Nicchitta, 2006). Sin embargo, la degradación de proteínas virales no alteradas inmediatamente después de su síntesis sería una explicación

alternativa para ambas observaciones (Rock et al, 2014). Un escenario en el que los DRiPs sean una fuente importante de péptidos de origen viral complicaría aun más la predicción de los péptidos antigénicos que reconocerían los linfocitos T CD8+ en el contexto de la infección por HSV-1.

Además de la selección del repertorio de péptidos antigénicos que presenta a los linfocitos T, el polimorfismo HLA modifica también otros aspectos de la presentación antigénica. Varios ejemplos de ello son su influencia sobre sus niveles de expresión, la velocidad de su ensamblaje, la estabilidad de sus formas carentes de péptidos o la dependencia para su expresión de un complejo de carga plenamente funcional. En la infección por HSV-1, cuya proteína ICP47 puede bloquear el TAP, la capacidad de ciertas moléculas HLA para cargarse de péptidos de manera independiente de la tapasina les conferiría una importante ventaja sobre las demás. Si bien esta independencia de la tapasina implica una carga subóptima con péptidos antigénicos, su paso hacia la membrana celular es más rápido en comparación con las variantes dependientes de la tapasina. Efectivamente, un estudio reciente demuestra que tanto HLA-B*18 como HLA-B*35 funcionan de manera independiente de la tapasina (Rizvi et al, 2014), lo que apoya nuestros resultados que clasifican a estos alelos como protectores frente a la infección clínica por HSV-1.

Puesto que la eficacia de la presentación antigénica en cada individuo depende del conjunto de moléculas HLA que expresa, estudios dirigidos al análisis de genotipos HLA completos (en lugar de genes aislados) deberían facilitar el entendimiento del papel del polimorfismo HLA en el control del curso clínico de la infección por HSV-1.

2. Las implicaciones de la variabilidad de los KIR y sus ligandos

Las células NK son un componente clave en la respuesta frente a infecciones virales activándose, mediante la integración de señales recibidas de receptores inhibidores e activadores, en respuesta a una serie de alteraciones de lo propio inducidas por patógenos. Los KIR, considerando sus características funcionales y su gran variabilidad genética, podrían ser altamente relevantes en el control de la infección por HSV-1. En efecto, un estudio previo de nuestro grupo ha encontrado que la presencia de *KIR2DL2* y *KIR2DS2* en el genoma confiere susceptibilidad a sufrir recurrencias de la infección. Confirmamos este resultado en la serie actual y, además, encontramos que la asociación con la enfermedad es aún más fuerte al analizar la presencia conjunta de los genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* y su ligando HLA-C-1.

La alta complejidad genética, estructural y funcional de los KIR no permite formular una hipótesis única que explique estos resultados. En primer lugar, la asociación casi

completa de *KIR2DL2* y *KIR2DS2* en un haplotipo muy conservado impide identificar el principal responsable de la asociación encontrada, basándose exclusivamente en los datos epidemiológicos. En segundo lugar, la alta homología entre los dos receptores en su fragmento extracelular apunta a un ligando común, aunque todavía es controvertido si *KIR2DS2* reconoce o no HLA-C1 (más detalles sobre este aspecto están recogidos en la introducción). Esa alta homología entre *KIR2DL2* y *KIR2DS2* ha complicado también la generación de anticuerpos monoclonales mono-específicos. Sin embargo, el grupo de Cristelle Retière ha desarrollado recientemente un anticuerpo anti-*KIR2DS2/2DL3* (David et al, 2009) que, en combinación con anticuerpos anti-*KIR2DL3* y anti-*KIR2DL2/2DL3/2DS2* podría permitir distinguir las células NK que expresen *KIR2DS2* en presencia o ausencia de *KIR2DL2* y elucidar, por tanto, el papel de cada uno en la infección por HSV-1. En tercer lugar, el polimorfismo alélico y el repertorio de péptidos que presentan las diferentes moléculas HLA, que modifican también las interacciones KIR-ligando, dificultan aun más este escenario.

Se han descrito alelos de *KIR2DL2* y *KIR2DS2* con baja frecuencia en la población que codifican proteínas con expresión o función alteradas. Así, *KIR2DL2*004* codifica una proteína que está retenida intracelularmente, mientras que *KIR2DL2*006*, *KIR2DL2*009* y *KIR2DL2*011* son muy similares a *KIR2DL3*001* en la región responsable del reconocimiento de su ligando y, por tanto, podrían codificar receptores de menor afinidad para HLA-C (VandenBussche et al, 2006; Falco et al, 2013). *KIR2DS2*003* codifica una proteína que carece de lisina en el fragmento transmembrana, por lo que no se asocia a DAP12 y, por tanto, no transmite señales activadoras (Bottino et al, 2000). En el estudio actual no hemos tenido en cuenta el polimorfismo alélico de estos KIR, pero la baja frecuencia en la población de estas variantes alélicas frente a los alelos comunes (Hou et al, 2012) hace que sea poco probable que nuestros resultados se vean afectados significativamente por la inclusión de algún individuo con un alelo *KIR2DL2* o *KIR2DS2* con función alterada.

De manera similar al reconocimiento de HLA-E por CD94/NKG2, la naturaleza de los péptidos unidos a las moléculas HLA modifica en ocasiones la afinidad de los KIR por sus ligandos, lo que ha sido confirmado también para *KIR2DL2* (Boyington et al, 2000; Fadda et al, 2010). Pero mientras que la unión de *KIR2DL2* a su ligando HLA es muy sensible a mutaciones en estos péptidos, no parece que ocurra lo mismo con *KIR2DS2* (Stewart et al, 2005). En el contexto de la infección por HSV-1, las células NK podrían explotar la selectividad para su ligando generada por péptidos virales, activándose en presencia de células infectadas independientemente de la disminución de la expresión de moléculas HLA.

La importancia de KIR2DL2 en la susceptibilidad a HSV-1 podría estar relacionada con su mayor afinidad para HLA-C en comparación con KIR2DL3 y KIR2DS2 (Moesta et al, 2008; David et al, 2013). Esta alta afinidad implicaría una menor sensibilidad de las células NK KIR2DL2⁺ a la disminución de los niveles de HLA en las células infectadas. O bien, si no hubiera disminución significativa de la expresión de HLA-C, KIR2DL2 establecería un umbral de inhibición demasiado alto para ser contrarrestado por otros receptores activadores estimulados por la infección. Esta inhibición excesiva de las células NK ejercida por KIR2DL2, en cualquiera de los dos escenarios, está apoyada por el hecho de que la presencia conjunta de dos parejas KIR–ligando de alta afinidad, KIR2DL2–HLA-C1 y KIR2DL1–HLA-C2, aumenta aún mas el riesgo de sufrir reactivaciones de la infección (Moraru et al, 2012a). En contraposición a esta hipótesis, ensayos *in vitro* con clones de células NK KIR2DL2⁺ o KIR2DS2⁺ enfrentadas a fibroblastos HSV-1⁺ sugieren un papel importante de KIR2DL2 en la lisis de estas dianas, en las que la presencia del virus disminuye la expresión de sus ligandos (Huard y Früh, 2000). Variaciones significativas de la afinidad de KIR2DL2 para su ligando introducidas por los repertorios de péptidos de las células HSV-1⁺ podrían también explicar estos resultados. En ambos casos, una activación excesiva de los clones de células NK KIR2DL2⁺ en presencia del virus en la piel o mucosas, podría ser responsable de que las reactivaciones sean clínicamente manifiestas. Análisis exhaustivos del nivel de activación de los clones de células NK KIR2DL2⁺ presentes en las lesiones de pacientes con recurrencias de la infección podrían esclarecer su papel en la susceptibilidad a HSV-1, pero este tipo de ensayos resultan a priori complicados. Igualmente, diferencias significativas en la proporción de células KIR2DL2⁺ entre los individuos sintomáticos y asintomáticos podrían justificar el aumento de la susceptibilidad al HSV-1 determinada por este receptor, pero estos estudios fenotípicos no se han realizado todavía.

Aunque en las células NK la inhibición vía KIR2DL2 sobrepasa el efecto de KIR2DS2, la distribución variegada de los receptores de las células NK permite que haya clones KIR2DS2⁺KIR2DL2⁻ que, además, podrían carecer de otros receptores inhibidores para moléculas HLA. Los diferentes modelos de educación de las células NK indican que en individuos que expresan HLA-C1 estos clones estarían anérgicos. Sin embargo, modelos murinos sugieren que este proceso podría ser reversible, siendo ciertos estímulos capaces de generar unas potentes señales moduladoras de la respuesta inmunitaria mediada por receptores para MHC activadores (Bolanos y Tripathy, 2011; Jonker et al, 2010). Puesto que un modelo similar sería también válido para clones KIR2DS1⁺KIR2DL1⁻ en sujetos que expresan HLA-C2, este modelo no

explica, por sí solo, por qué la presencia de *KIR2DS2* podría aumentar el riesgo de sufrir enfermedad herpética recurrente.

En el contexto de la infección por HSV-1, un estudio previo encontró una alta actividad citolítica de los clones de células NK *KIR2DS2*⁺ en presencia de fibroblastos autólogos infectados con HSV-1 (Pietra et al, 2000). La presencia de estos clones en la piel o mucosas de individuos infectados con HSV-1 podría ser responsable de la lisis extensa de los queratinocitos HSV-1⁺, contribuyendo así a que las reactivaciones del virus sean clínicamente manifiestas. O, por el contrario, un efecto subversivo moderado del HSV-1 sobre la expresión de HLA-C, que es generalmente baja, podría ser suficiente para impedir la activación de las células *KIR2DS2*⁺*KIR2DL2*⁻ en presencia de dianas infectadas, disminuyendo así el control dependiente de las células NK sobre la infección. Una confirmación de esta segunda hipótesis requeriría más estudios, ya que los datos disponibles hasta ahora relativos al efecto del HSV-1 sobre la expresión de HLA-C son contradictorios. Mientras que en los experimentos de Pietra et al, los fibroblastos HSV-1⁺ mantienen la expresión de HLA-C (a diferencia de HLA-A y -B), Huard y Früh encuentran que la infección con HSV-1 o la transfección con ICP47 disminuyen la expresión de HLA-C de células HeLa (Huard y Früh, 2000; Pietra et al, 2000). La controversia respecto a si *KIR2DS2* reconoce o no HLA-C1 complica aún más este escenario.

Si *KIR2DS2* reconoce (también), directa- o indirectamente, ligandos virales se desconoce todavía. Igualmente inexplorado está el papel de *KIR2DS2* en los linfocitos T en el contexto de la infección por HSV-1. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de *KIR2DS2* y de su ligando en el genoma, acompañada de una alta frecuencia de clones de linfocitos T citotóxicos *CD4*⁺*CD28*^{null}*KIR2DS2*⁺*KIR2DL2*⁻ ha sido propuesta como factor de riesgo para la vasculitis reumatoide (Yen et al, 2001). La contribución de *KIR2DS2* a la patogénesis de esta enfermedad se explicaría por su función co-estimuladora en presencia de estímulos subóptimos recibidos a través del TCR. Una hipótesis similar ha sido formulada para explicar la susceptibilidad a diabetes tipo I determinada por *KIR2DS2* y su ligando (van der Silk et al, 2003) y podría justificar también su efecto deletéreo en la infección por HSV-1.

En conjunto, aunque sean en gran medida contradictorios, los datos disponibles hasta ahora parecen apoyar más un modelo en el que *KIR2DL2* y no *KIR2DS2* predispone a sufrir recurrencias de la infección. Pero a falta de más ensayos fenotípicos y funcionales, queda por demostrar de qué manera la expresión de estos KIR modificaría la respuesta inmunitaria frente a dianas HSV-1⁺.

3. El receptor NKG2C

Para identificar de manera sencilla y rápida a aquellos individuos que carecen de una o de las dos copias del gen *KLRC2* diseñamos un método de PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSP), que permite el estudio de cada muestra de ADN en una única reacción (Moraru et al, 2012b; **Figura 10**). Entre las ventajas de este método de genotipado en comparación con otros publicados previamente, destacan su simplicidad, su fácil aplicación para grandes colecciones de muestras, la necesidad de cantidades relativamente pequeñas de ADN e, importantemente, su alta sensibilidad y especificidad. Además, este método no solo permite identificar la presencia o ausencia del gen, sino también la hemizigosis, representando, por tanto, una manera sencilla de cuantificar la dosis génica mediante PCR estándar. Utilizamos este método para genotipar un panel de muestras de referencia de fácil acceso (Moraru et al, 2012b), que debería facilitar a otros laboratorios el estudio del número de copias de *KLRC2*, proporcionando muestras para los controles de calidad de cada laboratorio. El hecho de que nuestra técnica haya sido ya utilizada para la determinación del número de copias del gen en otras publicaciones avala su validez y robustez (Li et al, 2015; Muntasell et al, 2013; Noyola et al, 2012; Rangel-Ramirez et al, 2014; Vilchez et al, 2013).

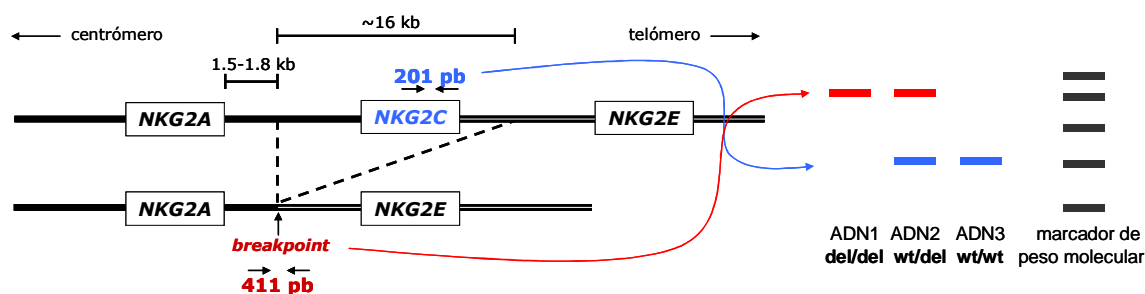


Figura 10. Diseño del método de genotipado del número de copias del gen *KLRC2*. Las flechas indican los fragmentos de ADN amplificados en la PCR y la posición relativa de la secuencia complementaria en el genoma (cromosoma 4). Las distancias entre los genes y sus tamaños no están a escala. (Mapa génico basado en Miyashita et al, 2004.)

Pese a su relevancia potencial en el control de la infección por HSV-1, no encontramos ninguna relación entre la presencia de la delección completa de *KRLC2*, en homo- o heterozigosis, y el curso clínico de la infección por HSV-1.

Varios estudios, algunos en colaboración con nuestro grupo, han relacionado el número de copias de *KRLC2* con los niveles de expresión de NKG2C en individuos seropositivos para hCMV (Goodier et al, 2014; Muntasell et al, 2013; Noyola et al, 2012).

Además, se ha observado una expansión preferente de células NKG2C^{bright} en infecciones agudas por otros virus (p. ej. hantavirus y chikungunya virus) en individuos coinfectados con hCMV (Björkström et al, 2011a; Petidemange et al, 2011). Aunque se desconoce si HSV-1 induce también alguna reconfiguración del repertorio de células NK, no se ha encontrado una correlación entre la expansión de NKG2C^{bright} y la seropositividad HSV-1 (Gumá et al, 2004). Apoyando este último dato, en otro estudio tampoco se ha observado una expansión significativa de células NK altamente diferenciadas en respuesta a HSV-2 (Björkström et al, 2011b).

Los resultados anteriores apuntan a un papel redundante del receptor NKG2C en la infección por HSV-1. Sin embargo, la expansión de una población de células NK NKG2C^{bright} en respuesta a hCMV se acompaña de importantes cambios, no solo fenotípicos sino también funcionales (Muntasell et al, 2013; Muntasell et al, Costa-Garcia et al, 2015) que sugieren que esta subpoblación linfocitaria, presente en proporciones muy variables en los individuos expuestos a hCMV, podría modular la respuesta de las células NK en otras infecciones. En este sentido, sería de interés estudiar el posible papel de esta subpoblación altamente diferenciada de células NK en el control de la infección por HSV-1. Notablemente, un estudio reciente ha encontrado que una subpoblación de células NK FcεRIγ⁻ que, en su mayoría, tienen un fenotipo NKG2C^{bright}CD57⁺, producen cantidades significativamente mayores de IFN-γ en comparación con el resto de las células NK en presencia de células infectadas por HSV-1 y hCMV y opsonizadas con anticuerpos específicos (Zhang et al, 2013a).

Si bien la respuesta citotóxica directa de este subtipo de células NK con características de memoria frente a dianas HSV-1⁺ no se ha estudiado todavía, analizamos su papel en la ADCC *in vitro*. Los estudios fenotípicos de las células NK que degranulan en respuesta a fibroblastos HSV-1⁺ opsonizados señalan también una contribución preferente a la ADCC de las células NK NKG2C^{bright} y las CD57⁺, siendo la subpoblación NKG2C^{bright}NKG2A⁻FcεRIγ⁻CD57⁺ la más citotóxica en el contexto de la infección por HSV-1 (Moraru et al, 2015b). Si la presencia de este subtipo de células NK altamente diferenciadas se correlaciona con el curso clínico de la infección por HSV-1, queda por ser demostrado.

La presencia de al menos una copia de *KRLC2* parece ser prescindible para el control de la infección por HSV-1 y hCMV, resultado coincidente con su redundancia para el control de otra infección viral, por el papiloma virus humano (Vilchez et al, 2013). Estudios en pacientes seropositivos para hCMV sugieren que la delección completa de *KRLC2* podría estar compensada por la expresión de KIR activadores (Della Chiessa et al, 2014). Análisis fenotípicos de las células NK, incluyendo los patrones de expresión

de KIR y NKG2C, podrían, por tanto, contribuir a explicar las diferencias interindividuales en la eficacia del control de la infección por HSV-1.

4. El polimorfismo genético de los complejos FCGR e IGH

La respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos abarca mecanismos complejos, estableciendo un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. De particular relevancia en las infecciones virales es su contribución a la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. La ADCC, un mecanismo de gran importancia para el aclaramiento de muchos agentes patógenos, depende de la unión de la IgG a antígenos virales y a FcγR (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Mientras que la alta afinidad de la unión del paratopo a su epítipo viral es el resultado de una serie de procesos somáticos en los genes que codifican las regiones variables de las IgG, la fuerza de unión Fc – FcγR depende en parte de polimorfismos genéticos en los loci *FCGR* e *IGHG*. Igualmente, la variación del número de copias de varios de los genes del complejo *FCGR*, que condicionaría los niveles de expresión de los receptores que codifican, podría influir sobre la intensidad de las señales transmitidas a través de estos FcγR. Puesto que la afinidad del FcγR por la IgG podría determinar el resultado global de la respuesta inmunitaria frente al HSV-1, estudiamos la posible contribución de varios polimorfismos funcionales en *FCGR* e *IGHG* al curso clínico de la infección. Notablemente, al analizar una amplia serie de marcadores genéticos del locus *FCGR*, descartamos posibles asociaciones debidas a desequilibrios de ligamiento entre ellos. En concreto, el estudio se centró en los alotipos de la IgG1 y de la cadena ligera kappa, las variaciones genéticas en *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C* y *FCGR3A*, y las posibles interacciones entre los mismos.

4.1. Los alotipos CD16A-158V y G1m3

El dimorfismo funcional de *FCGR3A*, que cambia la afinidad de CD16A por la IgG, podría modificar el aclaramiento del HSV-1 porque este FcγR se expresa a altos niveles en la mayoría de las células NK, generando potentes respuestas citotóxicas tras su activación (Lanier, 1998). Efectivamente, encontramos que la presencia de un alotipo CD16A de alta afinidad (158-V) en homocigosis confiere protección frente a las reactivaciones de la infección por HSV-1 (Moraru et al, 2012a). Pero un interés similar tienen también los polimorfismos en los genes que codifican la región constante de la cadena pesada de las IgG, sobre todo los que determinan los alotipos de la IgG1 más frecuentes en caucasoides (Pandey et al, 2012). Si bien la presencia de un alotipo IgG1 de mayor afinidad para CD16 (G1m3) no contribuye por si sola significativamente a la resistencia a HSV-1, análisis exhaustivos encontraron que el efecto protector del

genotipo CD16A-158V/V está restringido a aquellos individuos homocigotos para G1m3 (Moraru et al, 2015b). Por el contrario, no encontramos asociaciones significativas entre el curso clínico de la infección por HSV-1 y los alotipos de la cadena ligera κ .

Puesto que este efecto protector de los alotipos CD16A e IgG1 podría estar determinado, al menos en parte, por su contribución a la ADCC mediada por las células NK, analizamos la capacidad de degranulación de estas células en un modelo *in vitro* de ADCC frente a fibroblastos infectados por HSV-1. CD107a (LAMP-1) es un marcador de los gránulos citotóxicos que puede ser detectado en la membrana celular durante su exocitosis. La detección de la expresión de CD107a en las células NK es un método comúnmente utilizado para la evaluación de la respuesta citotóxica. Aunque no permite una cuantificación de la muerte de las dianas, se convierte en una técnica de primera elección en modelos *in vitro* de infección, donde la muerte puede ser causada tanto por el propio microorganismo como por las células efectoras a evaluar. Además, la seguridad de su uso y el hecho de que permite la caracterización fenotípica de las células que están degranulando justifican nuestra elección.

De acuerdo con nuestra hipótesis de partida, confirmamos que la presencia conjunta de los genotipos CD16A-158V/V y G1m3/3 se asocia a mayor frecuencia de células NK que degranulan en presencia de dianas HSV-1⁺ opsonizadas, comparado con las demás combinaciones de alotipos CD16A e IgG1 (Moraru et al, 2015b). Además y pese a que no hayamos encontrado una influencia significativa de los alotipos IgG1 aislados sobre el curso clínico de la infección, encontramos que un porcentaje mayor de células NK degranulan en presencia de sueros de donantes G1m3/3 comparado con G1m17/17, independientemente del genotipo CD16A. De manera similar, aunque el alotipo CD16A-158V no tiene efecto protector frente a las reactivaciones de la infección en los sujetos G1m17/17, el efecto del dimorfismo CD16A-158V/F sobre la intensidad de la ADCC es significativo tanto en presencia de sueros G1m3/3 como G1m17/17.

En el contexto de la infección por HSV-1, otro factor que podría modificar la intensidad de la ADCC frente a células infectadas es el señuelo viral que se une a IgG (Fc γ Rv). Estudios previos han demostrado que el Fc γ Rv se une con mayor afinidad a IgG con alotipo G1m17,1 comparado con G1m3 (Armour et al, 2002; Atherton et al, 2000). La menor afinidad de la unión Fc γ Rv – G1m3 podría favorecer la unión a CD16A de los anticuerpos anti-HSV-1 con alotipo IgG1, contribuyendo, por tanto, al aumento de la intensidad de la ADCC en los individuos G1m3/3 observado en nuestros experimentos funcionales. Sin embargo, el efecto de los alotipos IgG sobre la intensidad de la ADCC mediada por células NK en nuestro modelo de infección *in vitro* no se explica

exclusivamente por la presencia del FcγRv. Aunque no se pueda descartar el papel del FcγRv *in vivo*, nuestros resultados sugieren que el efecto del genotipo G1m3/3 sobre la intensidad del ADCC está relacionado en parte con su modulación directa de la afinidad CD16A-IgG1.

4.2. El dimorfismo funcional CD32A-131H/R

Se ha descrito que el alotipo CD32A-131H se une con mayor afinidad a IgG2 que CD32A-131R y este aumento de afinidad modula la intensidad de la fagocitosis mediada por CD32A (Salmon et al, 1992). Nuestros resultados demuestran que el curso clínico de la infección herpética no se correlaciona con los alotipos CD32A (Moraru et al, 2012a). Como se ha mencionado en la introducción, los anticuerpos anti-HSV-1 de subclase IgG2 se encuentran solo en un pequeño porcentaje de los individuos seropositivos, mientras que casi todos tienen anticuerpos específicos de tipo IgG1 (Mathiesen et al, 1998). No obstante, no hemos determinado las subclases de los anticuerpos anti-HSV-1 en nuestra cohorte. Dado que el dimorfismo CD32A-131H/R solo reduce marginalmente la afinidad de CD32A por los complejos inmunes con IgG1 (ambos alotipos reconocen eficazmente estos complejos) (Bruhns et al, 2009), el sesgo poblacional entre las dos subclases (la escasez de individuos con anticuerpos de tipo IgG2) podría explicar nuestros resultados. Otra posible explicación residiría en la expresión preferente de CD32A en monocitos/macrófagos y el papel marginal que juega la fagocitosis en el control de la infección por HSV-1 en comparación con la ADCC.

4.3. Los polimorfismos genéticos que condicionan la expresión de CD32B y CD32C en las células NK

La alta homología entre varios de los genes del locus *FCGR*, la variación del número de copias de algunos de ellos y, particularmente, la casi completa identidad en las secuencias de nucleótidos que existe entre las regiones 5' (hasta el exón 4) de *FCGR2B* y *FCGR2C*, y 3' (a partir del exón 5) de *FCGR2A* y *FCGR2C*, ha dificultado el estudio del polimorfismo genético de esta región mediante técnicas de PCR estándar. Con el desarrollo del método de amplificación múltiple de sondas dependiente de la ligación (MLPA), que permite cuantificar simultáneamente el número de copias de hasta 50 genes y la presencia de diferentes SNPs en varios de ellos en una única reacción, estos problemas han sido, en parte, superados. Utilizamos esta técnica para identificar a la minoría de individuos con una secuencia de *FCGR2C* que predice su expresión en la membrana plasmática (CD32C^{ORF}) y estudiar su posible contribución a la susceptibilidad al HSV-1. Aunque, hipotéticamente, la expresión de

CD32C en las células NK de una minoría de individuos podría proporcionarles una ventaja, aumentando los niveles de activación de estas células en presencia de dianas infectadas y opsonizadas, no encontramos asociaciones significativas entre la presencia de CD32C^{ORF} y el desarrollo de reactivaciones de la infección por HSV-1 (Moraru et al, 2015b).

El desequilibrio de ligamiento entre los diferentes polimorfismos del locus *FCGR* podría introducir sesgos en los estudios de asociación. Efectivamente, un trabajo previo había encontrado que CD32C^{ORF} y CD16A-158V se heredan juntos en un porcentaje significativo de individuos (Lejeune et al, 2012). Confirmamos el desequilibrio de ligamiento entre CD32C^{ORF} y CD16A-158V en nuestra serie y analizamos la contribución de cada uno de estos marcadores genéticos en ausencia del otro al curso clínico de la infección por HSV-1. La falta de asociación entre CD32C^{ORF} y la predisposición a sufrir recurrencias en los individuos con y sin un genotipo CD16AV/V (que confiere protección frente a la infección) confirman que la expresión de CD32C en las células NK no contribuye significativamente a la susceptibilidad al HSV-1 (Moraru et al, 2015b).

Estudios de lisis redirigida (rADCC) indican que la expresión de CD32C en las células NK condiciona la intensidad del rADCC (Metes et al, 1998; Ernst et al, 2002). Sin embargo, el único ensayo publicado hasta ahora que analiza la contribución de CD32C a la ADCC mediada por células NK en presencia de CD16 como competidor para la IgG no ha podido demostrar que CD32C tenga un papel significativo en ello (Heijden et al, 2012). En nuestro modelo de infección por HSV-1 tampoco observamos una contribución significativa de la presencia de CD32C a la intensidad global de la ADCC (degranulación de células NK) frente a dianas HSV-1⁺ opsonizadas (Moraru et al, 2015b). La menor afinidad de CD32C para la IgG, su expresión en una minoría de las células NK y los niveles de expresión relativamente bajos en comparación con CD16 podrían explicar nuestros resultados. Por otro lado, una competición eficaz entre FcγRv y CD32C podría impedir que este último se una a IgG anti-HSV-1. Para descartar completamente su posible contribución a la ADCC en el contexto de la infección por HSV-1 serían necesarios estudios con cantidades no limitantes de IgG específica y un análisis de la contribución a la ADCC de células NK CD32C⁺. Aún así, nuestros resultados (epidemiológicos y funcionales) descartan que, en condiciones fisiológicas, la expresión de CD32C contribuya significativamente al control de la infección.

Si bien clásicamente se consideraba que el receptor inhibitor CD32B se expresa solamente en linfocitos B y en células de estirpe mieloide, durante la última década varios estudios han encontrado también expresión de CD32B en las células NK de una minoría de individuos (Ernst et al, 2002; Stewart-Akers et al, 2004; Dutertre et al, 2008). Estudios posteriores han demostrado que la expresión de CD32B en las células NK (CD32B^{NK}) se asocia con una delección de ~70 Kpb en el locus *FCGR*. Esta delección incluye *FCGR2C*, *FCGR3B* y parte de la región intergénica *FCGR3B* – *FCGR2B*, lo que sugiere que los elementos reguladores que determinan la expresión de CD32C en las células NK controlan la expresión de CD32B en estos individuos (Heijden et al, 2012; Muller et al, 2013, ver **figura 8** de la introducción). Su expresión en este subtipo linfocitario sería potencialmente relevante, ya que podría competir con CD16A por la unión de la IgG, bloqueando, por tanto, la activación de las células NK en presencia de inmunocomplejos.

Dos estudios independientes indican que la expresión de CD32B en las células NK modifica la intensidad de la ADCC *in vitro* (Dutertre et al, 2018; Heijden et al, 2012). En nuestro modelo de ADCC frente a dianas HSV-1⁺ opsonizadas no encontramos una inhibición general significativa de la degranulación de las células NK por CD32B ni asociación con la enfermedad (Moraru et al, 2015b). En el contexto de la infección por HSV-1, el FcγRv, que se une a IgG humana con mayor afinidad que CD32B (Atherton et al, 2000; Bruhns et al, 2009), podría contrarrestar el efecto de CD32B sobre la ADCC mediada por células NK. Los resultados de los ensayos funcionales y de asociación apoyan un modelo en el que la expresión de CD32B no modifica significativamente la respuesta inmunitaria frente a HSV-1 (Moraru et al, 2015b). Sin embargo, una limitación de nuestro estudio es que no analizamos selectivamente la degranulación de las células NK CD32B⁺ y, por tanto, no podemos descartar un efecto menor de CD32B en esta subpoblación.

En resumen, encontramos que interacciones epistáticas entre los alotipos CD16A-158V y G1m3 modifican la intensidad de la ADCC frente a dianas HSV-1⁺ y el curso clínico de la infección. Por el contrario, esta respuesta es independiente de variaciones genéticas que afectan a la afinidad de CD32A por su ligando o a la expresión de CD32B y CD32C en las células NK. En conjunto, estos datos apoyan el papel clave de la ADCC mediada por células NK y del polimorfismo genético que condiciona su intensidad en la respuesta inmunitaria frente a HSV-1.

5. Otros polimorfismos genéticos del hospedador que modifican el curso clínico de la infección

Los avances significativos en la genómica de los últimos años y su disponibilidad para la investigación clínica han contribuido a esclarecer el papel de la variabilidad genética del hospedador en la evolución de varias infecciones virales (Cooke y Hill, 2001; Tuite y Gross, 2006). Sin embargo, aunque este tipo de estudios podrían mejorar nuestro entendimiento sobre el control de la infección por HSV-1, solamente se ha realizado por ahora un rastreo del genoma humano en búsqueda de marcadores genéticos que condicionen las reactivaciones de la infección. Este estudio identificó una región en el cromosoma 21 (Hobbs et al, 2008) y, posteriormente un gen en esta región como responsable de la susceptibilidad a sufrir reactivaciones, que denominaron *CSSG-1* (*Cold Sore Susceptibility Gene 1*) (Kriesel et al, 2011). *CSSG-1* codifica una proteína intracelular con función todavía desconocida, por lo que todavía se requieren más estudios para identificar mecanismos potenciales a través de los que *CSSG-1* modificaría el curso clínico de la infección.

Notablemente, los rastreos del genoma han sido diseñados para identificar polimorfismos puntuales, pero no son adecuados para analizar otro tipo de alteraciones como las deleciones o inserciones, la variación de número de copias, las variantes alélicas raras y el polimorfismo de familias multigénicas altamente homólogas, como las estudiadas en este trabajo. Para ello, los ensayos basados en una hipótesis previa, construida sobre la relevancia de ciertos genes en el control de la infección y métodos específicos, siguen siendo clave en la búsqueda marcadores genéticos predictivos de resistencia a la infección.

En este sentido, otros estudios basados en hipótesis previas han identificado, por ejemplo, una serie de mutaciones en genes implicados en la vía de activación TLR3-IFN como responsables del desarrollo de la HSE (detallado en el apartado 5.1. de la introducción), confirmando la importancia de esta ruta de activación celular en el control de la infección por HSV-1 en el sistema nervioso central (Zhang et al, 2013b). Su papel en el desarrollo de las recurrencias de la infección es, sin embargo, cuestionado. Así, solo una pequeña minoría de los niños portadores de estos defectos genéticos han sufrido más de un episodio de HSE y muy pocos de estos pacientes (y de sus familiares) han tenido herpes labial (Abel et al, 2010; Guo et al, 2011; Spiegel et al, 2008). Si bien un estudio posterior indica que un cambio de una leucina por fenilalanina (F412L) en la secuencia de TLR3 aumenta el riesgo de sufrir recurrencias de la infección, estos resultados requieren confirmación en series más amplias (Yang et al, 2012).

También relevantes para la susceptibilidad a la infección por HSV-1 son algunos estudios de asociación que relacionaron la presencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* con una mayor capacidad de neuroinvasión del virus y con la predisposición a sufrir recurrencias (Burgos et al, 2003; Itzhaki 2008). *APOE* codifica la Apolipoproteína E (ApoE), el principal componente de las lipoproteínas de muy baja densidad, cuya relevancia en el contexto de la infección por HSV-1 podría correlacionarse con su capacidad para unirse a la gB del HSV-1 o a proteoglicanos (Huemer et al, 1988; Ji et al, 1994). Puesto que varios virus RNA dependen de la ApoE para su paso hacia el interior de la células infectadas (Agnello, PNAS 1999, Finkelshtein, PNAS 2013, Chang et al, 2007, Faustino et al, 2014), una posible explicación para su papel en la infección herpética podría ser la capacidad variable, alelo-dependiente, de la ApoE para unirse a la gB y favorecer la infectividad del HSV-1. Alternativamente, la competición entre el HSV-1 y la ApoE para unirse a proteoglicanos y, en particular, la unión menos eficiente de la ApoE- $\epsilon 4$, podría favorecer la unión de HSV-1 a heparan sulfato y, consecuentemente, el paso del virus a través de la membrana plasmática (Lin et al, 2001).

En conjunto, nuestros resultados y los de otros autores muestran cómo la susceptibilidad a la infección por HSV-1 es modificada por variaciones genéticas que afectan a la respuesta inmunitaria frente al virus (**Figura 11**). En particular, nuestros datos demuestran que la infección sintomática por HSV-1 se relaciona con algunos genes polimórficos que controlan la inmunidad adaptativa y su interacción con la inmunidad innata: HLA de clase I, combinaciones de KIR2DL2 o KIR2DS2 y sus ligandos y de CD16A e IgG1, pero no HLA de clase II, NKG2C, o CD32A, B y C. Nuestros análisis de asociación y los ensayos funcionales apoyan la importancia de los linfocitos citotóxicos y del polimorfismo genético en el control de las recurrencias de la infección.

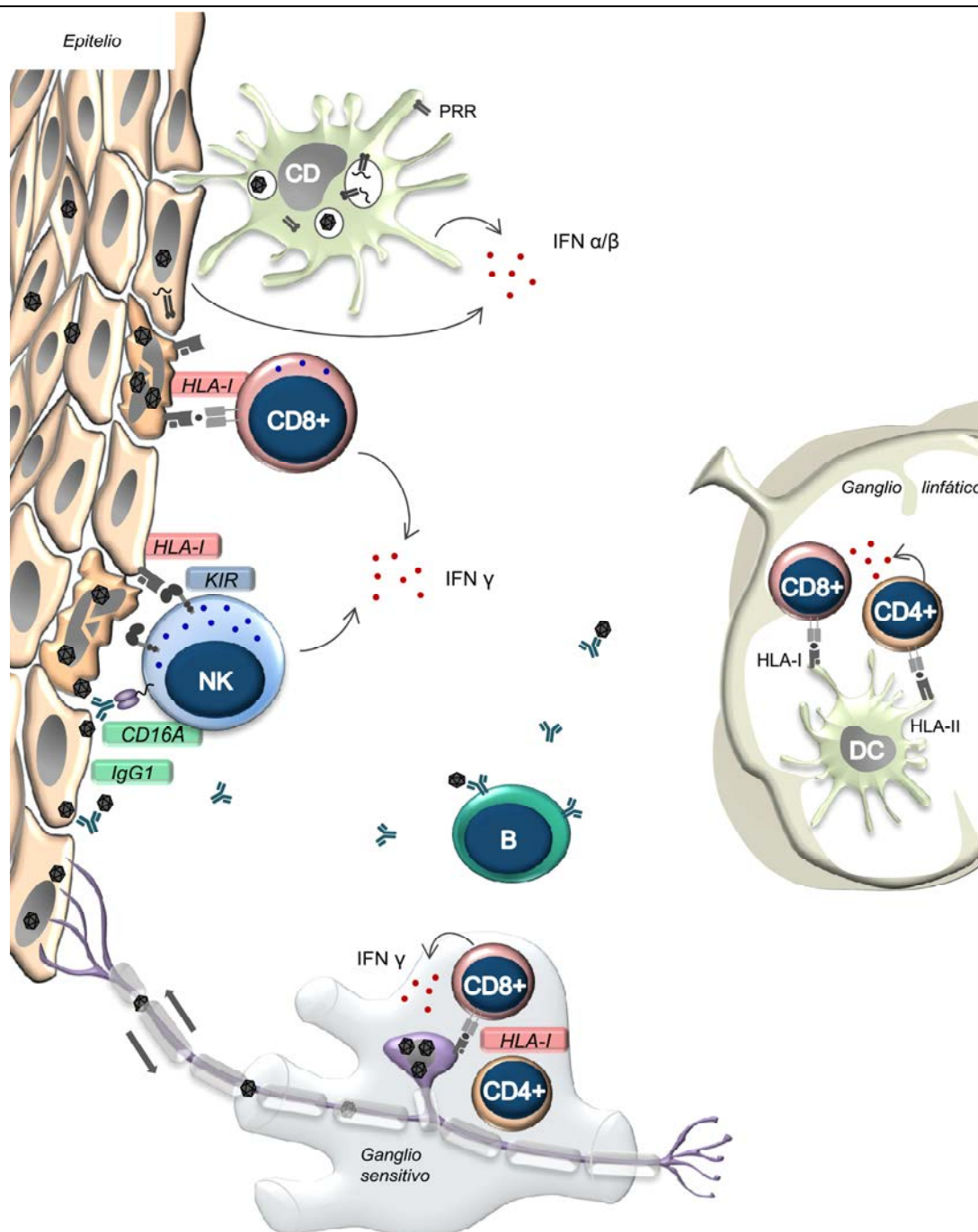


Figura 11. Esquema de la respuesta inmunitaria frente a HSV-1. Solamente algunas de las moléculas relevantes están representadas; se han resaltado aquellas cuyos polimorfismos han sido identificados en el trabajo actual como marcadores predictivos del curso clínico de la infección. La escala de cada elemento es arbitraria.

1. HLA-B*18 disminuye la susceptibilidad a la enfermedad recurrente por HSV-1, mientras que HLA-C*15 y el grupo de alelos que codifican A19 aumentan el riesgo de sufrirla.
2. El polimorfismo genético del locus HLA de clase II DRB1 no modifica el curso clínico de la infección por HSV-1.
3. La presencia en el genoma de *KIR2DL2* y *KIR2DS2* junto con alelos HLA con el epítipo C1, predispone a sufrir infección recurrente por HSV-1.
4. El número de copias del gen *KLRC2*, que codifica el receptor activador NKG2C, no modifica la susceptibilidad a HSV-1.
5. Los alotipos 158V de CD16A y G1m3 de la IgG1 aumentan la intensidad de la ADCC mediada por células NK frente a dianas infectadas con HSV-1 incluso en ausencia de un señuelo FcγRv, y su presencia conjunta en homocigosis confiere protección frente a las recurrencias de la infección.
6. El dimorfismo funcional CD32A-131H/R y los alotipos de la cadena ligera κ de la Ig no modifican el riesgo de sufrir enfermedad por HSV-1.
7. La expresión de los receptores para el Fc de la IgG CD32B y CD32C en las células NK no afecta a la susceptibilidad al HSV-1 y a la ADCC.
8. En conclusión, la susceptibilidad al HSV-1 es modificada por variaciones genéticas que afectan a la respuesta inmunitaria frente al virus, particularmente la función de los linfocitos citotóxicos.

- Abel L, Plancoulaine S, Jouanguy E, et al. Age-dependent Mendelian predisposition to herpes simplex virus type 1 encephalitis in childhood. *J Pediatr* 2010; 157: 623-9, 629.e1.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12766-71.
- Allan RS, Waithman J, Bedoui S, et al. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 2006; 25: 153-62.
- Alter G, Martin MP, Teigen N, et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 2007; 204: 3027-36.
- Anfossi N, André P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006; 25: 331-42.
- Aramburu J, Balboa MA, Izquierdo M, López-Botet M. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and gamma/delta TCR+ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 1991; 147: 714-21.
- Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Palmquist JM, Lokensgard JR. TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol* 2005; 175: 4189-93.
- Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 107-21.
- Armour KL, Smith CS, Clark MR. Expression of human FcgammaRIIIa as a GPI-linked molecule on CHO cells to enable measurement of human IgG binding. *J Immunol Methods* 2010; 354: 20-33.
- Atherton A, Armour KL, Bell S, Minson AC, Clark MR. The herpes simplex virus type 1 Fc receptor discriminates between IgG1 allotypes. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2540-7.
- Azzi T, Lünemann A, Murer A, et al. Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood* 2014; 124: 2533-43.
- Barcy S, Corey L. Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4+ T cells. *J Immunol* 2001; 166: 6242-9.
- Bellón T, Heredia AB, Llano M, et al. Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J Immunol* 1999; 162: 3996-4002.
- Benedict CA, Ware CF. Virus targeting of the tumor necrosis factor superfamily. *Virology* 2001; 289: 1-5.
- van Bergen J, Koning F. The tortoise and the hare: slowly evolving T-cell responses take hastily evolving KIR. *Immunology* 2010; 131: 301-9.
- Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 2010; 5: e11966.
- Béziat V, Dalgard O, Asselah T, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol* 2012; 42: 447-57.
- Béziat V, Liu LL, Malmberg JA, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 2013; 121: 2678-88.
- Björkström NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010; 116: 3853-64.
- Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* 2011a; 208: 13-21.
- Bodmer WF, Albert E, Bodmer JG, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. *Tissue Antigens* 1988; 32: 177-87.

- Bolanos FD, Tripathy SK. Activation receptor-induced tolerance of mature NK cells in vivo requires signaling through the receptor and is reversible. *J Immunol* 2011; 186: 2765-71.
- di Bona D, Scafidi V, Plaia A, et al. HLA and killer cell immunoglobulin-like receptors influence the natural course of CMV infection. *J Infect Dis* 2014; 210: 1083-9.
- Bottino C, Falco M, Sivori S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R. Identification and molecular characterization of a natural mutant of the p50.2/KIR2DS2 activating NK receptor that fails to mediate NK cell triggering. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3569-74.
- Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 2003; 198: 557-67.
- Boulet S, Sharafi S, Simic N, et al. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS* 2008; 22: 595-9.
- Bourdetsky D, Schmelzer CE, Admon A. The nature and extent of contributions by defective ribosome products to the HLA peptidome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E1591-9.
- Boutell C, Everett RD. Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *J Gen Virol* 2013; 94: 465-81.
- Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Brooks AG, Sun PD. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000; 405: 537-43.
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998a; 391: 795-9.
- Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 1998b; 8: 1-10.
- Breunis WB, van Mirre E, Bruin M, et al. Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008; 111: 1029-38.
- Breunis WB, van Mirre E, Geissler J, et al. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat* 2009; 30: E640-50.
- Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol* 2009; 30: 143-9.
- Brown ZA, Benedetti J, Ashley R, et al. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *N Engl J Med* 1991; 324: 1247-52.
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009; 113: 3716-3725.
- Brusilovsky M, Cordoba M, Rosental B, et al. Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J Immunol* 2013; 191: 5256-67.
- Brusilovsky M, Radinsky O, Yossef R, Campbell KS, Porgador A. Carbohydrate-mediated modulation of NK cell receptor function: structural and functional influences of heparan sulfate moieties expressed on NK cell surface. *Front Oncol* 2014; 4: 185.
- Bryant-Hudson KM, Gurung HR, Zheng M, Carr DJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 facilitate corneal lymphangiogenesis in response to herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* 2014; 88: 14451-7.
- Burgos JS, Ramirez C, Sastre I, Bullido MJ, Valdivieso F. ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport* 2003; 14: 1825-7.
- Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, et al. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 39-48.

- Cai MS, Li ML, Zheng CF. Herpesviral infection and Toll-like receptor 2. *Protein Cell* 2012; 3: 590-601.
- Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2009; 73: 1-8.
- Campadelli-Fiume G. The egress of alphaherpesviruses from the cell. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press 2007: 12: 151-62.
- Cantoni C, Biassoni R, Pende D, et al. The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene. *Eur J Immunol* 1998; 28: 327-38.
- Carr DJ, Wuest T, Ash J. An increase in herpes simplex virus type 1 in the anterior segment of the eye is linked to a deficiency in NK cell infiltration in mice deficient in CXCR3. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28: 245-51.
- Carr WH, Rosen DB, Arase H, Nixon DF, Michaelsson J, Lanier LL. Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol* 2007; 178: 647-51.
- Carrington M, Alter G. Innate immune control of HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a007070.
- Carrington M, Walker BD. Immunogenetics of spontaneous control of HIV. *Annu Rev Med* 2012; 63: 131-45.
- Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science* 2007; 317: 617-9.
- Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 2006; 314: 308-12. Epub 2006 Sep 14.
- Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007; 81: 13783-93.
- Chase RA, Pottage JC, Haber MH, Kistler G, Jensen D, Levin S. Herpes simplex viral hepatitis in adults: two case reports and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 329-33.
- Chee AV, Roizman B. Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signalling pathway at multiple sites. *J Virol* 2004; 78: 4185-96.
- Chen M, Bouvier M. Analysis of interactions in a tapasin/class I complex provides a mechanism for peptide selection. *EMBO J* 2007; 26: 1681-90.
- Chen SH, Kramer MF, Schaffer PA, Coen DM. A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* 1997; 71: 5878-84.
- della Chiesa M, Falco M, Bertaina A, et al. Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C-/- umbilical cord blood. *J Immunol* 2014; 192: 1471-9.
- Chisholm SE, Howard K, Gómez MV, Reyburn HT. Expression of ICP0 is sufficient to trigger natural killer cell recognition of herpes simplex virus-infected cells by natural cytotoxicity receptors. *J Infect Dis* 2007; 195: 1160-8.
- Cook M, Briggs D, Craddock C, et al. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107: 1230-2.
- Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 967-77.
- Corey L, Langenberg AGM, Ashley R, et al. Two double-blind, placebo-controlled trials of a vaccine containing recombinant gD2 and gB2 antigens in MF59 adjuvant for the prevention of genital HSV-2 acquisition. *JAMA* 1999; 282: 331-340.

Costa-Garcia M, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. *J Immunol*. 2015; 194: 2715-24.

Cunningham AL, Turner RR, Miller AC, Para MF, Merigan TC. Evolution of recurrent herpes simplex lesions. An immunohistologic study. *J Clin Invest* 1985; 75: 226-33.

Daubeuf S, Singh D, Tan Y, et al. HSV ICP0 recruits USP7 to modulate TLR-mediated innate response. *Blood* 2009; 113: 3264-75.

David G, Morvan M, Gagne K, et al. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 2009. 128: 172-84.

David G, Djaoud Z, Willem C, et al. Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 specificity of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation. *J Immunol* 2013; 191: 4778-88.

Decman V, Kinchington PR, Harvey SA, Hendricks RL. Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J Virol*. 2005 Aug;79(16):10339-47.

Derfuss T, Segerer S, Herberger S, et al. Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia. *Brain Pathol* 2007; 17: 389-98.

Dervillez X, Qureshi H, Chentoufi AA, et al. Asymptomatic HLA-A*02:01-restricted epitopes from herpes simplex virus glycoprotein B preferentially recall polyfunctional CD8+ T cells from seropositive asymptomatic individuals and protect HLA transgenic mice against ocular herpes. *J Immunol* 2013 : 191: 5124-38.

Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 5736-41.

Dubin G, Socolof E, Frank I, Friedman HM. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol* 1991; 65: 7046-50.

Durbin RK, Kotenko SV, Durbin JE. Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol Rev* 2013; 255: 25-39.

Dutertre CA, Bonnin-Gélizé E, Pulford K, Bourel D, Fridman WH, Teillaud JL. A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory FcγRIIB modulating antibody-dependent function. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1511-20.

Elbadawy HM, Gailledrat M, Desseaux C, Ponzin D, Ferrari S. Targeting herpetic keratitis by gene therapy. *J Ophthalmol*. 2012; 2012: 594869.

Ernst LK, Metes D, Herberman RB, Morel PA. Allelic polymorphisms in the FcγRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med*. 2002; 80: 248-57.

Estefanía E, Gómez-Lozano N, Portero F, et al. Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens* 2007; 70: 34-41.

Everett RD, Meredith M, Orr A, Cross A, Kathoria M, Parkinson J. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* 1997; 16: 1519-30.

Everett RD. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* 2000; 22: 761-70.

Fadda L, Borhis G, Ahmed P, et al. Peptide antagonism as a mechanism for NK cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10160-5.

- Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351: 290-6.
- Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens* 2013 : 82: 363-73.
- Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaëlsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* 2010; 115: 1166-74.
- Faustino AF, Carvalho FA, Martins IC, et al. Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. *Nanomedicine* 2014; 10: 247-55.
- Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P, Margolis TP. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 978-83.
- Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 7306-11.
- Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, et al. Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med* 2005; 11: 1056-8.
- Forbes LR, Paessler M, Orange JS. CD16 deficiency discovered in a cohort of patients with severe herpesviral infections using a new diagnostic test. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: S67.
- Frank I, Friedman HM. A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J Virol* 1989; 63: 4479-88.
- Frank GM, Lepisto AJ, Freeman ML, Sheridan BS, Cherpes TL, Hendricks RL. Early CD4(+) T cell help prevents partial CD8(+) T cell exhaustion and promotes maintenance of Herpes Simplex Virus 1 latency. *J Immunol* 2010; 184: 277-86.
- Frank GM, Buela KA, Maker DM, Harvey SA, Hendricks RL. Early responding dendritic cells direct the local NK response to control herpes simplex virus 1 infection within the cornea. *J Immunol* 2012; 188: 1350-9.
- Frederick DM, Bland D, Gollin Y. Fatal disseminated herpes simplex virus infection in a previously healthy pregnant woman. A case report. *J Reprod Med* 2002; 47: 591-6.
- Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Seidel CA, Cines DB. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 1984; 309: 633-5.
- Fries LF, Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Hammer CH, Frank MM. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 is an inhibitor of the complement cascade. *J Immunol* 1986; 137: 1636-41.
- Gallina G, Cumbo V, Messina P, Modica MA, Caruso C. MHC-linked genetic factors (HLA-B35) influencing recurrent circumoral herpetic lesions. *Dis Markers* 1987; 5: 191-7.
- Ghiasi H, Wechsler SL, Kaiwar R, Nesburn AB, Hofman FM. Local expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-2 correlates with protection against corneal scarring after ocular challenge of vaccinated mice with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1995; 69: 334-40.
- Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F, Bruhns P. Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol* 2014; 5: 254.
- Goodier MR, White MJ, Darboe A, et al. Rapid NK cell differentiation in a population with near-universal human cytomegalovirus infection is attenuated by NKG2C deletions. *Blood* 2014; 124: 2213-22.
- Graef T, Moesta AK, Norman PJ, et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 2009; 206: 2557-72.

- Grier JT, Forbes LR, Monaco-Shawver L, et al. Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest* 2012; 122: 3769-80.
- Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004; 104: 3664-71.
- Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, et al. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis* 2006; 194: 38-41.
- Gumperz JE, Barber LD, Valiante NM, et al. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol* 1997; 158: 5237-41.
- Guo Y, Audry M, Ciancanelli M, et al. Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2011; 208: 2083-98.
- Haldane J. Disease and evolution. *Ric Sci Suppl* 1949 A19: 68-76.
- van der Heijden J, Breunis WB, Geissler J, de Boer M, van den Berg TK, Kuijpers TW. Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J Immunol* 2012; 188: 1318-24.
- van der Heijden J, Geissler J, van Mirre E, et al. A novel splice variant of FcγRIIa: a risk factor for anaphylaxis in patients with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 1408-16.e5.
- Held K, Derfuss T. Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia--current overview. *J Neurovirol* 2011; 17: 518-27.
- Hendricks DW, Balfour HH Jr, Dunmire SK, Schmeling DO, Hogquist KA, Lanier LL. Cutting edge: NKG2C(hi)CD57+ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. *J Immunol* 2014; 192: 4492-6.
- Herman M, Ciancanelli M, Ou YH, et al. Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. *J Exp Med* 2012; 209: 1567-82.
- Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes Immun* 2003; 4: 160-7.
- Hill A, Jugovic P, York I, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 1995; 375: 411-5.
- Hobbs MR, Jones BB, Otterud BE, Leppert M, Kriesel JD. Identification of a herpes simplex labialis susceptibility region on human chromosome 21. *J Infect Dis* 2008; 197: 340-6.
- Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 311-31.
- Hollox EJ, Hoh BP. Human gene copy number variation and infectious disease. *Hum Genet* 2014; 133: 1217-33.
- Hou L, Chen M, Ng J, Hurley CK. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. *Genes Immun* 2012; 13: 47-58.
- Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, Phillips JH, Ryan JC. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 1997; 158: 3603-9.
- Huard B, Früh K. A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 509-15.
- Huemer HP, Menzel HJ, Potratz D, et al. Herpes simplex virus binds to human serum lipoprotein. *Intervirology* 1988; 29: 68-76.
- Hwang I, Zhang T, Scott JM, et al. Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcRγ and specialized for antibody-dependent immune functions. *Int Immunol* 2012; 24: 793-802.

- Ishioka K, Ikuta K, Sato Y, et al. Herpes simplex virus type 1 virion-derived US11 inhibits type 1 interferon-induced protein kinase R phosphorylation. *Microbiol Immunol* 2013; 57: 426-36.
- Itzhaki R, Wozniak M. Susceptibility to herpes simplex labialis conferred by the gene encoding apolipoprotein E. *J Infect Dis* 2008; 198: 624-5.
- Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural Killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 408-13.
- Ji ZS, Fazio S, Lee YL, Mahley RW. Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1994; 269: 2764-72.
- Jiang X, Chentoufi AA, Hsiang C, et al. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can protect neuron-derived C1300 and Neuro2A cells from granzyme B-induced apoptosis and CD8 T-cell killing. *J Virol* 2011; 85: 2325-32.
- Jouanguy E, Gineau L, Cottineau J, Beziat V, Vivier E, Casanova JL. Inborn errors of the development of human natural killer cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13: 589-95.
- Johnson DC, Frame MC, Ligas MW, Cross AM, Stow ND. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J Virol* 1988; 62: 1347-54.
- Johnson KE, Knipe DM. Herpes simplex virus-1 infection causes the secretion of a type I interferon-antagonizing protein and inhibits signaling at or before Jak-1 activation. *Virology* 2010; 396: 21-9.
- Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 2009; 182: 4572-80.
- Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med* 2010; 207: 2065-72.
- Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 2005; 174: 2878-84.
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675-8.
- Kärre K. Natural killer cells and the MHC class I pathway of peptide presentation. *Semin Immunol* 1993; 5: 127-45.
- Keadle TL, Usui N, Laycock KA, Miller JK, Pepose JS, Stuart PM. IL-1 and TNF-alpha are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 96-102.
- Khan S, de Giuli R, Schmidtke G, et al. Neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *J Immunol* 2001; 167: 4801-4.
- Khanna KM, Lepisto AJ, Decman V, Hendricks RL. Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16: 463-9.
- Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 2006; 214: 186-201.
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005; 436: 709-13.
- Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 2008; 322: 268-71.

- Kobelt D, Lechmann M, Steinkasserer A. The interaction between dendritic cells and herpes simplex virus-1. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; 276: 145-61.
- Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol* 1999; 162: 2895-905.
- Koelle DM, Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 96-113.
- Koene HR, Kleijer M, Roos D, de Haas M, von dem Borne AE. Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. *Blood* 1998; 91: 673-9.
- Kohl S, Loo LS, Schmalstieg FS, Anderson DC. The genetic deficiency of leukocyte surface glycoprotein Mac-1, LFA-1, p150,95 in humans is associated with defective antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro and defective protection against herpes simplex virus infection in vivo. *J Immunol* 1986; 137: 1688-94.
- Kostavasili I, Sahu A, Friedman HM, Eisenberg RJ, Cohen GH, Lambris JD. Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *J Immunol* 1997; 158: 1763-71.
- Kramer MF, Coen DM. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* 1995; 69: 1389-99.
- Kriesel JD, Jones BB, Matsunami N, et al. C21orf91 genotypes correlate with herpes simplex labialis (cold sore) frequency: description of a cold sore susceptibility gene. *J Infect Dis* 2011; 204: 1654-62.
- Kristie TM, Roizman B. Differentiation and DNA contact points of host proteins binding at the cis site for virion-mediated induction of alpha genes of herpes simplex virus 1. *J Virol* 1988; 62: 1145-57.
- Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol* 2000; 74: 7127-36.
- Kummer M, Turza NM, Muhl-Zurbes P, et al. Herpes simplex virus type 1 induces CD83 degradation in mature dendritic cells with immediate-early kinetics via the cellular proteasome. *J Virol* 2007; 81: 6326-38.
- Kuśnierczyk P, Mozer-Lisewska I, Zwolińska K, et al. Contribution of genes for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) to the susceptibility to chronic hepatitis C virus infection and to viremia. *Hum Immunol* 76: 102-8.
- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 359-93.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-74.
- Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998; 8: 693-701.
- Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 1996; 157: 4741-5.
- Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998a 95: 5199-204.
- Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 1998b; 160: 4951-60.
- Lefranc MP, Lefranc G. Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism. *Methods Mol Biol* 2012; 882: 635-80.
- Leib DA, Machalek MA, Williams BR, Silverman RH, Virgin HW. Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6097-101.

- Lejeune J, Piègu B, Gouilleux-Gruart V, Ohresser M, Watier H, Thibault G. FCGR2C genotyping by pyrosequencing reveals linkage disequilibrium with FCGR3A V158F and FCGR2A H131R polymorphisms in a Caucasian population. *MABs* 2012; 4: 784-7.
- Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. *J Virol* 2012; 86: 6555-62.
- Leung DY. Why is eczema herpeticum unexpectedly rare? *Antiviral Res* 2013; 98: 153-7.
- Li Y, Mariuzza RA. Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. *Front Immunol* 2014; 5: 123.
- Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* 2001; 20: 1-13.
- Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD, Mossman KL. The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 2004; 78: 1675-84.
- Lin WR, Wozniak MA, Esiri MM, Klenerman P, Itzhaki RF. Herpes simplex encephalitis: involvement of apolipoprotein E genotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 117-9.
- van Lint AL, Murawski MR, Goodbody RE, et al. Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J Virol* 2010; 84: 10802-11.
- Liu J, Xiao Z, Ko HL, Shen M, Ren EC. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 2662-7.
- Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ, Hendricks RL. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med* 2000; 191: 1459-66.
- Liu T, Khanna KM, Carriere BN, Hendricks RL. Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. *J Virol* 2001; 75: 11178-84.
- van Loghem E, Natvig JB. Uncommon Gm gene complexes. *Vox Sang* 1970; 18: 421-34.
- López-Botet M, Pérez-Villar JJ, Carretero M, et al. Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules. *Immunol Rev* 1997; 155: 165-74.
- López-Botet M, Muntasell A, Vilches C. The CD94/NKG2C+ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol* 2014; 26: 145-51.
- Lundberg P, Welander PV, Edwards CK 3rd, van Rooijen N, Cantin E. Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol* 2007; 81: 1451-60.
- Lünemann A, Vanoaica LD, Azzi T, Nadal D, Münz C. A distinct subpopulation of human NK cells restricts B cell transformation by EBV. *J Immunol* 2013; 191: 4989-95.
- Marras F, Bozzano F, Ascierto ML, De Maria A. Baseline and Dynamic Expression of Activating NK Cell Receptors in the Control of Chronic Viral Infections: The Paradigm of HIV-1 and HCV. *Front Immunol* 2014; 5: 305.
- Marsh SG, Parham P, Dupont B, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*. 2003; 55: 220-6.
- Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 846-8.
- Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31: 429-34.
- Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 2007; 39: 733-740.

- Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* 2001; 167: 1179-87.
- Mathiesen T, Persson MA, Sundqvist VA, Wahren B. Neutralization capacity and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity of separated IgG subclasses 1, 3 and 4 against herpes simplex virus. *Clin Exp Immunol* 1988; 72: 211-215.
- Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A, Middleton D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: II. KIR2DS4. *Hum Immunol* 2004; 65: 613-21.
- Mayr WR, Mickerts D. [Human gamma globulin polymorphism. Calculation of its distribution in Vienna and its suitability in paternity cases]. *Acta Biol Med Ger* 1970; 25: 473-82.
- Melchjorsen J, Rintahaka J, Soby S, et al. Early innate recognition of herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase III-independent pathways. *J Virol* 2010; 84: 11350-8.
- Melroe GT, DeLuca NA, Knipe DM. Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol* 2004; 78: 8411-20.
- Merino AM, Dugast AS, Wilson CM, et al. KIR2DS4 promotes HIV-1 pathogenesis: new evidence from analyses of immunogenetic data and natural killer cell function. *PLoS One* 2014; 9: e99353.
- Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA. Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood* 1998; 91: 2369-80.
- Mikloska Z, Rückholdt M, Ghadiminejad I, et al. Monophosphoryl lipid A and QS21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell proteins 4 and 27 through IFN-gamma and IL-12 production. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):5167-76.
- Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, et al. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol* 2004; 16:163-8.
- Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 2008; 180: 3969-79.
- Moesta AK, Graef T, Abi-Rached L, Older Aguilar AM, Guethlein LA, Parham P. Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. *J Immunol*. 2010; 185: 4233-7.
- Moraru M, Cisneros E, Gómez-Lozano N, et al. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2012a; 188: 4412-20.
- Moraru M, Cañizares M, Muntasell A, de Pablo R, López-Botet M, Vilches C. Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction. *Tissue Antigens* 2012b; 80: 184-7.
- Moraru M, Vilches C. Host genetics and response to Herpes simplex type I infection. *Genomics, personalized medicine and oral disease*. Springer Publisher 2015a. *In press*.
- Moraru M, Black LE, Muntasell A, et al. NK cells and immunoglobulins interplay in defense against Herpes simplex virus type 1: epistatic interaction of CD16A and IgG1 allotypes of variable affinity modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity and susceptibility to clinical reactivation. *J Immunol* 2015b. *aceptado*.
- Mossman KL, Smiley JR. Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol* 2002; 76: 1995-8.
- Mossman KL, Ashkar AA. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol* 2005; 18: 267-81.
- Mueller M, Barros P, Witherden AS, et al. Genomic pathology of SLE-associated copy-number variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2B locus. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 28-40.

- Muntasell A, Lopez-Montanes M, Vera A, et al. NKG2C zygosity influences CD94/NKG2C receptor function and the NK-cell compartment redistribution in response to human cytomegalovirus. *Eur J Immunol* 2013; 43: 3268-78.
- Musso T, Calosso L, Zucca M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 1999; 93: 3531-9.
- Namboodiri AM, Pandey JP. Differential inhibition of trastuzumab- and cetuximab-induced cytotoxicity of cancer cells by immunoglobulin G1 expressing different GM allotypes. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 361-5.
- Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 443-53.
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Oddmund Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 823-36.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 34-47.
- Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur J Immunol* 2012; 42: 3256-66.
- Ogasawara K, Hida S, Azimi N, et al. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 1998; 391: 700-3.
- Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 515-25.
- Orbelyan GA, Tang F, Sally B et al. Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J Immunol* 2014 ; 193: 610-6.
- Orzalli MH, DeLuca NA, Knipe DM. Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: E3008-17.
- Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity* 2013; 38: 870-80.
- Pandey JP. Immunoglobulin genes and immunity to herpes simplex virus type 1. *J Infect Dis* 2012; 206: 143-4.
- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 201-14.
- Pende D, Biassoni R, Cantoni C, et al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 1996; 184: 505-18.
- Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 2009; 113: 3119-29.
- Pepose JS, Keadle TL, Morrison LA. Ocular Herpes Simplex: Changing Epidemiology, Emerging Disease Patterns, and the Potential of Vaccine Prevention and Therapy *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 547-57.
- Pereira RA, Simon MM, Simmons A. Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *J Virol* 2000; 74: 1029-32.
- Pereira RA, Scalzo A, Simmons A. A NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J Immunol* 2001; 166: 5869-73.

- Pérez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, et al. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity* 2010; 33: 400-11.
- Pérez-Villar JJ, Melero I, Rodríguez A, et al. Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. *J Immunol* 1995; 154: 5779-88.
- Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, et al. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 2000; 287: 1500-3.
- Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002268.
- Pietra G, Semino C, Cagnoni F, et al. Natural killer cells lyse autologous herpes simplex virus infected targets using cytolytic mechanisms distributed clonotypically. *J Med Virol* 2000; 62: 354-63.
- Plougastel B, Jones T, Trowsdale J. Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics* 1996; 44: 286-91.
- Pollara G, Jones M, Handley ME, et al. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. *J Immunol* 2004; 173: 4108-19.
- Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5674-9.
- Powell MS, Barton PA, Emmanouilidis D, et al. Biochemical analysis and crystallisation of Fc gamma RIIa, the low affinity receptor for IgG. *Immunol Lett* 1999; 68: 17-23.
- Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol* 2000; 81: 1-19.
- Preston CM, Efsthathiou S. Molecular basis of HSV latency and reactivation. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press 2007; 33: 602-15.
- Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, et al. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One*. 2010; 5: e15115.
- Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. The structure of a human type III Fc gamma receptor in complex with Fc. *J Biol Chem* 2001; 276: 16469-77.
- Rafferty MJ, Winau F, Kaufmann SH, Schaible UE, Schonrich G. CD1 antigen presentation by human dendritic cells as a target for herpes simplex virus immune evasion. *J Immunol* 2006; 177: 6207-14.
- Rager-Zisman B, Quan PC, Rosner M, Moller JR, Bloom BR. Role of NK cells in protection of mice against herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol* 1987; 138: 884-8.
- Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1093-100.
- Rangel-Ramírez VV, García-Sepulveda CA, Escalante-Padrón F, et al. NKG2C gene deletion in the Mexican population and lack of association to respiratory viral infections. *Int J Immunogenet* 2014; 41: 126-30.
- Rasmussen SB, Sorensen LN, Malmgaard L, et al. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol* 2007; 81: 13315-24.
- Rasmussen SB, Jensen SB, Nielsen C, et al. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol* 2009; 90: 74-8.

- Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 1987; 61: 3102-8.
- Rizvi SM, Salam N, Geng J et al. Distinct assembly profiles of HLA-B molecules. *J Immunol* 2014; 192: 4967-76.
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research* 2015 ; 43: D423-431.
- Rock KL, Farfán-Arribas DJ, Colbert JD, Goldberg AL. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol* 2014; 35: 144-52.
- Russell AS, Schlaut J. Association of HLA-A1 antigen and susceptibility to recurrent cold sores. *Arch Dermatol.* 1977; 113: 1721-2.
- Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest* 1992; 89: 1274-81.
- Sambrook JG, Bashirova A, Andersen H, et al. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC Genomics* 2006; 7: 209.
- Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Lorenzo L, et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest* 2011a; 121: 4889-902.
- Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Jouanguy E, Zhang SY, Casanova JL. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr Opin Virol* 2011b; 1: 487-96.
- Schanfield MS, Gergely J, Fudenberg HH. Immunoglobulin Allotypes of European Populations. I. Gm and Km(In) allotypic markers in Hungarians. *Hum Hered* 1975a; 25: 370-7.
- Schanfield MS, Herzog P, Fudenberg HH. Immunoglobulin allotypes of European populations. II. Gm, Am and Km (In) allotypic markers in Czechoslovakians. *Hum Hered* 1975b; 25: 382-92.
- Schönberg K, Sribar M, Enczmann J, Fischer JC, Uhrberg M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* 2011; 117: 98-107.
- Sen J, Liu X, Roller R, Knipe DM. Herpes simplex virus US3 tegument protein inhibits Toll-like receptor 2 signaling at or before TRAF6 ubiquitination. *Virology* 2013; 439: 65-73.
- Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* 2007; 196: 853-60.
- Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003; 300: 337-9.
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001; 276: 6591-604.
- Shum BP, Flodin LR, Muir DG, et al. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol* 2002; 168: 240-52.
- van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003; 52: 2639-42.
- Simonato M, Manservigi R, Marconi P, et al. Gene transfer into neurones for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 183-90.
- Sirianni MC, Bonomo R, Scarpati B, et al. Immunological responses of patients with recurrent herpes genitalis. *Diagn Immunol* 1986; 4: 294-8.
- Sivori S, Falco M, Carlomagno S, et al. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* 2010; 116: 1637-47.

- Snell GD. The genetics of transplantation. *J Natl Cancer Inst* 1953; 14: 691-704.
- Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 2000; 406: 267-73.
- van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc gamma R polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 2003; 61: 189-202.
- Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology*. 2000; 275: 1-8.
- Spiegel R, Miron D, Yodko H, Lumelsky D, Habib A, Horovitz Y. Late relapse of herpes simplex virus encephalitis in a child due to reactivation of latent virus: clinicopathological report and review. *J Child Neurol* 2008; 23: 344-8.
- Srivastava R, Khan AA, Spencer D, et al. HLA-A02:01-restricted epitopes identified from the herpes simplex virus tegument protein VP11/12 preferentially recall polyfunctional effector memory CD8+ T cells from seropositive asymptomatic individuals and protect humanized HLA-A*02:01 transgenic mice against ocular herpes. *J Immunol* 2015; 194: 2232-48.
- St Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A, Hendricks RL. Defining the herpes simplex virus-specific CD8+ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2011a; 186: 3927-33.
- St Leger AJ, Hendricks RL. CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. *J Neurovirol* 2011b; 17: 528-34.
- Starbeck-Miller GR, Badovinac VP, Barber DL, Harty JT. Expression of Fc gamma RIIb tempers memory CD8 T cell function in vivo. *J Immunol* 2014; 192: 35-9.
- Stern M, Hadaya K, Hönger G, et al. Telomeric rather than centromeric activating KIR genes protect from cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1302-7.
- Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13224-9.
- Stewart-Akers AM, Cunningham A, Wasko MC, Morel PA. Fc gamma R expression on NK cells influences disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2004; 5: 521-9.
- Straus SE, Wald A, Kost RG, et al. Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J Infect Dis* 1997; 176: 1129-34.
- Su K, Wu J, Edberg JC, McKenzie SE, Kimberly RP. Genomic organization of classical human low-affinity Fc gamma receptor genes. *Genes Immun* 2002; Suppl 1: S51-6.
- Su K, Wu J, Edberg JC, et al. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing Fc gamma RIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2004a; 172: 7186-91.
- Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing Fc gamma RIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. II. Differential binding of GATA4 and Yin-Yang1 transcription factors and correlated receptor expression and function. *J Immunol*. 2004b; 172: 7192-9.
- Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003; 300: 339-42.
- Suzutani T, Nagamine M, Shibaki T, et al. The role of the UL41 gene of herpes simplex virus type 1 in evasion of non-specific host defence mechanisms during primary infection. *J Gen Virol* 2000; 81: 1763-71.
- Taddeo B, Luo TR, Zhang W, Roizman B. Activation of NF-kappaB in cells productively infected with HSV-1 depends on activated protein kinase R and plays no apparent role in blocking apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12408-13.
- Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 580-92.

- Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. Herpes simplex virus. *Front Biosci* 2002; 7: 752-64.
- Thammavongsa V, Raghuraman G, Filzen TM, Collins KL, Raghavan M. HLA-B44 polymorphisms at position 116 of the heavy chain influence TAP complex binding via an effect on peptide occupancy. *J Immunol* 2006; 177: 3150-61.
- Theil D, Derfuss T, Paripovic I et al. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* 2003;163: 2179-84.
- Tiwari JL, Terasaki PI. HLA and disease associations. Springer-Verlag, 1985.
- Tomasec P, Braud VM, Rickards C, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000; 287: 1031.
- Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3959-67.
- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
- Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *Immunol Lett* 2011; 137: 1-8.
- Tuite A, Gros P. The impact of genomics on the analysis of host resistance to infectious disease. *Microbes Infect* 2006; 8: 1647-53.
- Uhrberg M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol Immunol* 2005; 42: 471-5.
- Ulbrecht M, Martinozzi S, Grzeschik M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 2000; 164: 5019-22.
- Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology* 2013; 218: 1312-21.
- Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, Strominger J. Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14326-31.
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; 7: 739-51.
- VandenBussche CJ, Dakshanamurthy S, Posch PE, Hurley CK. A single polymorphism disrupts the killer Ig-like receptor 2DL2/2DL3 D1 domain. *J Immunol* 2006; 177: 5347-57.
- de Vasconcelos JM, de Jesus Maués Pereira Mória L, Amaral Ido S, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms with chronic hepatitis C and responses to therapy in Brazil. *Genet Mol Biol* 2013; 36: 22-7.
- van Velzen M, Jing L, Osterhaus AD, Sette A, Koelle DM, Verjans GM. Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. *PLoS Pathog.* 2013; 9:e1003547.
- Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, et al. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 3496-501.
- Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
- Vilchez JR, Torres-Moreno D, Martínez-Senac MM, Trujillo-Santos J, Conesa-Zamora P. Evaluation of the association of NKG2C copy number variations with susceptibility to human papillomavirus-induced cervical lesions. *Hum Immunol* 2013; 74: 1352-6.
- Vogel K, Thomann S, Vogel B, Schuster P, Schmidt B. Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections. *Immunology* 2014; 143: 588-600.

de Vries E, Koene HR, Vossen JM, et al. Identification of an unusual Fc gamma receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood* 1996; 88: 3022-7.

Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 190-8.

Wadsworth S, Jacob RJ, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol*. 1975;15: 1487-97.

Wallace ME, Keating R, Heath WR, Carbone FR. The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J Virol* 1999; 73: 7619-26.

Wald A, Corey L, Cone R, Hobson A, Davis G, Zeh J. Frequent genital herpes simplex virus 2 shedding in immunocompetent women. Effect of acyclovir treatment. *J Clin Invest* 1997; 99: 1092-7.

Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344: 1058-66.

Wang S, Wang K, Li J, Zheng C. Herpes simplex virus 1 ubiquitin-specific protease UL36 inhibits beta interferon production by deubiquitinating TRAF3. *J Virol* 2013; 87: 11851-60.

Warmerdam PA, Nabben NM, van de Graaf SA, van de Winkel JG, Capel PJ. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem* 1993; 268: 7346-9.

Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, et al. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 1998; 246: 179-89.

Whitley R, Arvin A, Prober C, et al. Predictors of morbidity and mortality in neonates with herpes simplex virus infections. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *N Engl J Med* 1991; 324: 450-4.

Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 541-53.

WHO Nomenclature Committee. Nomenclature for Factors of the HL-A System, 1968. *Bull World Health Organ* 1968; 39: 483-6.

WHO. Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. WHO meeting on human immunoglobulin allotypic markers, held 16-19 July 1974, Rouen, France. Report amended June 1976. *J Immunogenet* 1976; 3: 357-62.

Williams AP, Peh CA, Purcell AW, McCluskey J, Elliott T. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 2002; 16: 509-20.

Wilson MJ, Torkar M, Haude A, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4778-83.

Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol*. 1998; 161: 571-7.

Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997; 100: 1059-70.

Xing J, Wang S, Lin R, Mossman KL, Zheng C. Herpes simplex virus 1 tegument protein US11 downmodulates the RLR signaling pathway via direct interaction with RIG-I and MDA-5. *J Virol* 2012; 86: 3528-40.

Xing J, Ni L, Wang S, Wang K, Lin R, Zheng C. Herpes simplex virus 1-encoded tegument protein VP16 abrogates the production of beta interferon (IFN) by inhibiting NF- κ B activation and blocking IFN regulatory factor 3 to recruit its coactivator CBP. *J Virol* 2013; 87: 9788-801.

- Yang CA, Raftery MJ, Hamann L, et al. Association of TLR3-hyporesponsiveness and functional TLR3 L412F polymorphism with recurrent herpes labialis. *Hum Immunol* 2012; 73: 844-51.
- Yen JH, Moore BE, Nakajima T, et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193: 1159-67.
- Yewdell JW, Nicchitta CV. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol* 2006; 27: 368-73.
- Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013 : 34: 573-82.
- Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007; 317: 1522-7.
- Zhang T, Scott JM, Hwang I, Kim S. Antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcR γ deficiency. *J Immunol*. 2013a; 190: 1402-6.
- Zhang SY, Abel L., Casanova JL. Mendelian predisposition to herpes simplex encephalitis. *Handb Clin Neurol* 2013b; 112, 1091-7.
- Zhang J, Wang K, Wang S, Zheng C. Herpes simplex virus 1 E3 ubiquitin ligase ICP0 protein inhibits tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation by interacting with p65/RelA and p50/NF- κ B1. *J Virol* 2013c; 87: 12935-48.
- Zhang J, Wang S, Wang K, Zheng C. Herpes simplex virus 1 DNA polymerase processivity factor UL42 inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation by interacting with p65/RelA and p50/NF- κ B1. *Med Microbiol Immunol* 2013d; 202: 313-25.
- Zimmerman TJ, McNeill JI, Richman A, Kaufman HE, Waltman SR. HLA types and recurrent corneal herpes simplex infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 756-7.

El trabajo realizado durante este periodo de formación postgrado se ha materializado en una serie de publicaciones que se recogen en este siguiente listado:

1. **Moraru M.**, Vilches C. Host genetics and response to Herpes simplex type I infection. Genomics, Personalized Medicine and Oral Disease, Springer 2015 *in press*.
2. **Moraru M**, Black LE, Muntasell A, Portero F, Millán I, Miguel López-Botet M, Reyburn HT, Pandey JP, Vilches C. NK cells and immunoglobulins interplay in defense against Herpes simplex virus type 1: epistatic interaction of CD16A and IgG1 allotypes of variable affinity modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity and susceptibility to clinical infection. J Immunol 2015. *aceptado. (artículo 3 de esta tesis)*
3. Costa-Garcia M, Vera A, **Moraru M**, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. J Immunol 2015; 194: 2715-24.
4. Cisneros E, Martínez-Pomar N, Vilches M, Martín P, de Pablo R, Nuñez Del Prado N, Nieto A, Matamoros N, **Moraru M**, Vilches C. Advancing allele group-specific amplification of the complete HLA-C gene--isolation of novel alleles from three allele groups (C*04, C*07 and C*08). Tissue Antigens 2013; 82: 280-5.
5. Muntasell A, López-Montañés M, Vera A, Heredia G, Romo N, Peñafiel J, **Moraru M**, Vila J, Vilches C, López-Botet M. NKG2C zygosity influences CD94/NKG2C receptor function and the NK-cell compartment redistribution in response to human cytomegalovirus. Eur J Immunol 2013; 43: 3268-78.
6. Cisneros E*, **Moraru M***, Gómez-Lozano N, López-Botet M, Vilches C. KIR2DL5: An Orphan Inhibitory Receptor Displaying Complex Patterns of Polymorphism and Expression. Front Immunol 2012; 3: 289. **ambos primeros autores*
7. Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, Noguera-Julian A, Muñoz-Almagro C, Alarcón A, Juncosa T, **Moraru M**, Vilches C, López-Botet M. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. Eur J Immunol 2012; 42: 3256-66.
8. **Moraru M**, Cañizares M, Muntasell A, de Pablo R, López-Botet M, Vilches C. Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction. Tissue Antigens 2012; 80:184-7. *(artículo 2 de esta tesis)*

9. Ordóñez D, **Moraru M**, Gómez-Lozano N, Cisneros E, Vilches C. KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers. *Methods Mol Biol. Springer* 2012; 882: 415-30.
10. **Moraru M**, Cisneros E, Gómez-Lozano N, de Pablo R, Portero F, Cañizares M, Vaquero M, Roustán G, Millán I, López-Botet M, Vilches C. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2012; 188: 4412-20.
(artículo 1 de esta tesis)
11. **Moraru M**, Balas A, de Pablo R, Vicario JL, Vilches C. Allele-specific amplification of the complete HLA-C gene from genomic DNA - a novel Cw4 allele (C*04:71) with a Cw1 motif in the peptide-binding site. *Tissue Antigens* 2012; 79: 291-4.
12. Cisneros E, **Moraru M**, de Pablo R, Vilches C. A method for simple and accurate identification of the multiple sclerosis associated allele HLA-DRB1*1501 in neuroscience research laboratories. *J Neuroimmunol.* 2010; 225: 143-8.